

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
NEUROCIÊNCIAS

**INFLUÊNCIA DAS VARIAÇÕES DE CUIDADO  
MATERNO NA REATIVIDADE AO ESTRESSE DE RATOS  
NO PERÍODO NEONATAL**

Dissertação de Mestrado

**Thiago Pereira Henriques**

Porto Alegre, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
NEUROCIÊNCIAS

**INFLUÊNCIA DAS VARIAÇÕES DE CUIDADO  
MATERNO NA REATIVIDADE AO ESTRESSE DE RATOS  
NO PERÍODO NEONATAL**

**Thiago Pereira Henriques**

**Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion**  
**Co-Orientadora: Profa. Dra. Rosa Maria Martins de Almeida**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em  
Neurociências.

Porto Alegre, 2009

*“(...) o amor materno na infância é tão importante para a saúde mental quanto são as vitaminas e proteínas para a saúde física.”*

*John Bowlby, 1951.*

*Ao Hélio e à Elda, pelo cuidado parental proporcionado.*

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Estresse.....	4
1.2 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal.....	5
1.3 Gênero e Estresse.....	8
1.4 Ocitocina e Estresse.....	9
1.5 Neuroquímica da Reposta ao Estresse.....	11
1.5.1 Serotonina e Estresse.....	13
1.5.2 Dopamina e Estresse.....	15
1.5.3 Noradrenalina e Estresse.....	17
1.6 Respostas ao Estresse no Período Neonatal.....	22
1.6.1 Aspectos Ontogenéticos das Monoaminas.....	24
1.7 Interação Mãe-Filhote.....	28
1.8 Eventos Ambientais no Início da Vida.....	30
1.9 Variações Naturais de Cuidado Materno.....	32
2. OBJETIVOS.....	37
2.1 Geral.....	38
2.2 Específicos.....	38

3. MÉTODOS.....	40
3.1 Tipo de estudo.....	41
3.2 Local.....	41
3.3 Coleta de dados.....	41
3.4 Análise estatística.....	41
3.5 Aspectos éticos.....	42
3.6 Animais.....	42
3.7 Avaliação do cuidado materno.....	43
3.8 Procedimentos experimentais com os animais.....	45
3.9 Grupos Experimentais.....	46
3.10 Análises Bioquímicas.....	48
3.10.1 Dosagem de Corticosterona Plasmática por Radioimunoensaio.....	48
3.10.2 Dosagem de Ocitocina Plasmática por Radioimunoensaio.....	48
3.10.3 Dosagem de Monoaminas por Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detecção Eletroquímica (HPLC-ED).....	49
4. RESULTADOS.....	52
4.1 Comportamento Materno.....	53
4.2 Corticosterona e Ocitocina Plasmáticas nos Filhotes.....	55
4.2.1 Corticosterona Plasmática dos Filhotes.....	55
4.2.2 Ocitocina Plasmática dos Filhotes.....	56
4.3 Atividade da Serotonina, Dopamina e Níveis de Noradrenalina no Hipotálamo.....	57
4.3.1 Atividade da Serotonina do Hipotálamo.....	57
4.3.2 Atividade da Dopamina no Hipotálamo.....	58

4.3.3 Níveis de Noradrenalina no Hipotálamo.....	59
4.4 Atividade da Serotonina e Níveis de Noradrenalina no Hipocampo.....	60
4.4.1 Atividade da Serotonina do Hipocampo.....	60
4.4.2 Níveis de Noradrenalina no Hipocampo.....	61
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÕES.....	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
8. ANEXO.....	138
8.1 Planilha de Registro de Comportamento Materno.....	139

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion, pela sabedoria a qual me ajudou a crescer profissionalmente.

À minha co-orientadora Prof. Dra. Rosa Maria Martins de Almeida, pela atenção, compreensão e apoio.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento, por toda consideração, incentivo e por terem acreditado em mim. Agradeço especialmente ao Bruno Carlo Cerpa Aranda e à Vanise Sebben, pela indispensável e incondicional ajuda nos procedimentos com os animais no meu projeto. Agradeço também à Natália Uriarte, a qual teve uma participação fundamental ao me ensinar os procedimentos comportamentais e ao me ajudar a transformar meus dados comportamentais em resultados.

À Profa. Dra. Patrícia Pelufo Silveira, por toda a gentil ajuda ao longo do meu mestrado. Eu a considero como sendo uma de minhas co-orientadoras.

À Dona Geni, por ter sido tão prestativa e amável sempre que eu precisava de animais para meu trabalho.

Às bibliotecárias do ICBS, pela cortesia e eficiência ao me ajudarem a pedir artigos via COMUT, os quais foram essenciais para a elaboração desta dissertação.

À preciosa colaboração dos pesquisadores da USP de Ribeirão Preto, Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci e Profa. Dra. Janete Aparecida Anselmo-Franci. Os resultados bioquímicos obtidos neste projeto são graças à contribuição do laboratório deles. Agradeço pela disponibilidade e paciência do Dr. Raphael Escorsim Szawka na valiosa dosagem de minhas amostras no HPLC e também pela atenciosa acolhida em Ribeirão Preto. Agradeço também ao Ruither de Oliveira Gomes Carolino pelo grande auxílio nas dosagens.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Hélio Eduardo Silva Henriques e Elda Pereira Henriques, por todo o carinho, compreensão, estímulo e apoio incondicionais em todos os momentos da minha vida. Agradeço também a toda a minha família e aos meus amigos de verdade.

À Luisinha, uma pessoa muito especial em minha vida. Agradeço não só por toda ajuda nas diversas etapas do meu mestrado, mas também por todo amor, carinho, paciência e compreensão nos momentos difíceis, incentivo e por sempre acreditar em mim. Ela também representa para mim um exemplo de ser humano por ter um coração lindo e um cérebro admirável.

Enfim, Agradeço a todos que, de alguma forma, me ajudaram a ser uma pessoa mais feliz e realizada.



## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA.....	Ácido 5-hidroxiindoleacético
5-HT.....	5-hidroxitriptamina ou serotonina
5-HT <sub>1</sub> , 5-HT <sub>2</sub> e 5-HT <sub>7</sub> .....	Tipos de receptores serotoninérgicos
5-HT <sub>1A</sub> e 5-HT <sub>1B</sub> .....	Subtipos de receptores serotoninérgicos
α <sub>2</sub> .....	Subtipo de receptor α-adrenérgico
AMPc.....	Adenosina monofosfato cíclico
ACTH.....	Hormônio Adrenocorticotrópico
ADN.....	Ácido desoxirribonucléico
ANOVA.....	Análise de variância
ARNm.....	Ácido ribonucléico mensageiro
AVP.....	Arginina-vasopressina
BNST.....	Núcleo próprio da <i>stria terminalis</i>
CA.....	Catecolamina
COMT.....	Catecol-O-metil-transferase
CORT.....	Corticosterona
CPF.....	Córtex pré-frontal
CRH.....	Hormônio Liberador da Corticotropina
D <sub>1</sub> -D <sub>3</sub> .....	Subtipos de receptores dopaminérgicos
DA.....	Dopamina
DHPG.....	3,4-dihidroxifenilglicol
DOPA.....	Dihidroxifenilalanina

DOPAC.....	Ácido diidróxilfenilacético
E#.....	Dia embrionário
GABA.....	Ácido gama-aminobutírico
G.....	Glicocorticóide
HHA.....	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HVA.....	Ácido homovalínico
LC.....	<i>Locus ceruleus</i>
NGFI-A.....	Proteína indutora de fator de crescimento de nervo
M.....	Mineralocorticóide
MAO.....	Monoamina oxidase
MC.....	Muito-cuidadora/Muito-cuidado
MHPG.....	3-metoxi-4-hidroxifenilglicol
NA.....	Noradrenalina
Nacc.....	Núcleo <i>accumbens</i>
OT.....	Ocitocina
P#.....	Dia pós-parto
PC.....	Pouco-cuidadora/Pouco-cuidado
PHRE.....	Período Hiporresponsivo ao Estresse
POA.....	Área pré-óptica
POMC.....	Pró-ópiomelacortina
PVN.....	Núcleo Paraventricular
RG.....	Receptor de glicocorticóide
RM.....	Receptor de mineralocorticóide
SNC.....	Sistema Nervoso Central

SON.....	Núcleo Supraóptico
TI.....	Tuberoinfundibular
TRH.....	Hormônio estimulador de tireotropina
TSH.....	Tireotropina
VTA.....	Área tegmental ventral

## RESUMO

Durante as duas primeiras semanas após o nascimento, os ratos mostram respostas neuroendócrinas diminuídas ao estresse, caracterizando uma fase conhecida como o “período hiporresponsivo ao estresse”. No entanto, é um período sensível do desenvolvimento do sistema nervoso, no qual o animal é suscetível a eventos ambientais, tais como estresse e qualidade do cuidado materno, os quais podem ter efeitos duradouros no indivíduo. No presente estudo, foram investigados os níveis plasmáticos de corticosterona e ocitocina e a atividade monoaminérgica central em ratos neonatos submetidos ao estresse por frio. Também foram investigadas as possíveis influências do gênero e do cuidado materno recebido.

No final do 1º dia pós-parto (P0), 60 ratas Wistar tiveram suas ninhadas padronizados em 8 filhotes. Do P1 ao P10, as mães tiveram seus comportamentos maternos analisados de acordo com trabalhos anteriores, nos quais o comportamento de lambida foi tido como uma medida de qualidade de cuidado materno (frequência média de lambida da população =  $5,52 \pm 0,19$ ). As mães apresentando as menores e as maiores frequências de lambida foram selecionadas como Pouco-Cuidadoras (média < 4,18, n=12) e Muito-Cuidadoras (média > 6,99, n=10), respectivamente. No P13, um par de filhotes foi removido da ninhada e imediatamente sacrificado por decapitação (grupo controle) e outros dois pares foram removidos da ninhada e colocados em um recipiente plástico dentro de uma câmara fria (0°C, 6 min.), sendo sacrificados 15 e 30 min. após o término do estresse por frio. O sangue do tronco foi colhido para radioimunoensaio de corticosterona e ocitocina plasmáticas. Os encéfalos foram rapidamente removidos para dissecação dos hipotálamos e hipocampos que foram usados na análise das monoaminas e seus metabólitos na Cromatografia Líquida de Alta Performance.

A ANOVA de três vias com Post Hoc de Duncan mostrou um efeito do estresse aumentando a corticosterona plasmática ( $p < 0,001$ ), comparada ao período pré-estresse (basal). As filhotes fêmeas de ambos os grupos e os filhotes machos e fêmeas Muito-Cuidados apresentaram níveis maiores de ocitocina plasmática ( $p < 0,05$  para ambos), comparados aos Pouco-Cuidados. O estresse também diminuiu a atividade da dopamina ( $p = 0,05$ ), comparado aos grupos controles. O efeito do cuidado materno foi também

observado no hipocampo, cuja atividade serotoninérgica foi maior em filhotes Muito-Cuidados ( $p=0,05$ ), comparados a filhotes Pouco-Cuidados, independente do gênero.

Conforme relatado anteriormente em outros trabalhos, o estresse aumenta a corticosterona plasmática em filhotes, mesmo no período hiporresponsivo. Os níveis plasmáticos aumentados de ocitocina na prole Muito-Cuidada estão de acordo com evidências a respeito do papel deste hormônio no apego mãe-filhote. A ocitocina aumentada em filhotes fêmeas mostra que diferenças hormonais quanto ao gênero já estão presentes no início da vida de roedores. Interessantemente, o estresse diminuiu a atividade dopaminérgica, o que está de acordo com resultados encontrados em certas áreas hipotalâmicas de animais adultos expostos ao frio. É sugerido que esse efeito seja devido à peculiaridade do estresse por frio, uma vez que as respostas monoaminérgicas podem variar dependendo do estressor usado. O hipocampo foi sensível ao cuidado materno, o qual já foi anteriormente indicado por ser uma importante estrutura encefálica cuja atividade é influenciada por diferentes qualidades de cuidado materno por meio da sinalização serotoninérgica.

## ABSTRACT

During the first two weeks after birth the rats show decreased neuroendocrine responses to stress, characterizing a stage known as “stress hypo-responsive period”. However, this is a neurodevelopmental sensitive period in which the animal is susceptible to environmental events, such as stress and the quality of maternal care, which may have long-term effects upon the individual. It was investigated plasma corticosterone and oxytocin, and central monoaminergic activity in neonatal rats submitted to cold stress. It was also investigated the possible influences of gender and maternal care received.

In the end of 1<sup>o</sup> postpartum day (P0), the 60 Wistar dams had their litters culled to 8 pups. From P1 to P10, dams had their maternal behaviour analysed according to previous works, in which licking behaviour was taken as a measure of the quality of maternal care (population’s mean licking frequency=  $5.52 \pm 0.1863$ ). Dams showing the lower and higher frequencies of licking were selected as Low Licking (mean<4.1814, n=12) and High Licking (mean>6.991, n=10), respectively. At P13, a pair of pups was removed from the litter and immediately sacrificed by decapitation (control group) and other two pairs were removed from the litter and placed in a plastic container inside a cold chamber (0°C, 6 min), being sacrificed 15 and 30 min after the termination of the cold stress. Blood trunk was taken for plasma corticosterone and oxytocin radioimmunoassay. The brains were quickly removed for dissection of the hypothalami and hippocampi for monoamine and their metabolites High Performance Liquid Chromatography analysis.

The three-way ANOVA with Duncan Post Hoc showed an effect of stress increasing plasma corticosterone ( $p < 0.001$ ) compared to the control group (basal situation). The female pups of both groups and High Licked male and female pups showed higher levels of plasma oxytocin ( $p < 0.05$  for both). The stress also decreased hypothalamic dopamine turnover ( $p = 0.05$ ) compared to the control groups. The maternal effect was also found in the hippocampus, whose serotonergic activity was increased in High Licked pups ( $p = 0.05$ ), independent of gender.

As previously reported in other works, stress increases plasma corticosterone in the pups even in the stress hypo-responsive period. The increased plasma oxytocin levels in the High Licked offspring are according to evidences supporting the role of this hormone upon

the mother-infant attachment. The increased oxytocin in female pups shows that hormonal gender differences are present in the early life of rodents. Interestingly, it was found that stress decreased the hypothalamic dopaminergic activity, which is according to results found in certain hypothalamic areas of adult animals exposed to cold. It is suggested that this is due to the peculiarity of cold stress, since the monoaminergic responses vary depending on the stressor used. The only central effect of maternal care was found in the hippocampus, which was previously found to be an important brain structure whose activity is influenced by different qualities of maternal care through serotonergic signaling.

## *1. Introdução*

---



A falta de cuidado materno no início da vida pode ser um fator de risco para transtornos psiquiátricos tais como: a ansiedade e a depressão (PHILLIPS *et al.*, 2005). Logo, o estudo desse período da vida dos animais é fundamental, pois está relacionado ao desenvolvimento da emocionalidade a qual persistirá por toda a vida, mas que também já pode ser observado na infância (VÁZQUEZ *et al.*, 2002).

Existem dados na literatura a respeito dos efeitos de longa duração de diferentes intensidades de cuidado materno na reatividade ao estresse em animais experimentais adultos, mas não em filhotes (CUI *et al.*, 2004; KOSTEN *et al.*, 2004; LEVINE, 2001; VÁZQUEZ, 1998; WALKER *et al.*, 2003; WALKER *et al.*, 2004; YI & BARAM, 1994).

Nos roedores em desenvolvimento, as duas primeiras semanas de vida constituem o período denominado “Período Hiporresponsivo ao Estresse” (PHRE) (VÁZQUEZ, 1998; LEVINE, 2001), no qual a resposta da adrenal ao estresse é mínima ou inexistente. A exposição a estímulo ou estresse durante esses primeiros dias determina alterações neuroquímicas e comportamentais que podem ser observadas ao longo da vida.

Embora as respostas adrenais sejam limitadas no PHRE, alguns elementos encefálicos, tais como o hipotálamo, parecem ser responsivos a estressores de maneira específica de duração e de estímulo singulares ao animal em desenvolvimento (VÁZQUEZ *et al.*, 2002). O desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), incluindo a maturação dos sistemas de neurotransmissores é um processo complexo. É importante estudar o padrão de ontogenia dos diferentes neurotransmissores de modo a identificar seus tempos de aparecimento, tão bem quanto detectar suas distribuições e concentrações durante o desenvolvimento. No encéfalo imaturo de mamíferos, muitos neurotransmissores tais como a serotonina, dopamina e noradrenalina têm um papel inteiramente diferente daquele em um encéfalo maduro, agindo como sinais ou reguladores do desenvolvimento.

De fato, muitos dos principais sistemas monoaminérgicos tão bem quanto alguns neuropeptídeos têm apresentado esta função, como por exemplo, regular o desenvolvimento do SNC (Del OLMO & PAZOS, 2001).

Estudos sobre o cuidado materno têm mostrado a importância de um ambiente adequado para um desenvolvimento saudável, pois os recém-nascidos são bastante vulneráveis nesse período. Este trabalho busca compreender a ontogenia das respostas hormonais e neuroquímicas ao estresse, levando em conta a importância das variações naturais do cuidado materno no período neonatal. Logo, foram analisadas estruturas encefálicas chave envolvidas no eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) – o hipocampo e o hipotálamo – e as respostas hormonais no estresse em ratos de duas semanas de vida.

Assim, experimentos nesta área são importantes para relacionar eventos adversos na infância com o aparecimento de patologias futuras.

## 1.1 Estresse

O termo estresse foi primeiramente utilizado em 1936, pelo médico húngaro Hans Selye, na publicação “*What is Stress*”. Selye definiu o estresse como a “Síndrome da Adaptação Geral”, a qual era dividida em três etapas: alarme, resistência e exaustão. A primeira etapa consistia na identificação do agente estressor. A segunda etapa era aquela em que o organismo combatia o agente estressor com sucesso. E a terceira etapa, de onde advinham os efeitos deletérios do estresse, era o momento no qual o organismo chegava a um estado de exaustão, não conseguindo mais responder a esse agente (SELYE, 1936 *apud* KOPIN, 1995).

Segundo Selye, o estresse seria uma “resposta não-específica do corpo para qualquer demanda” (SELYE, 1976), posteriormente conhecida por “doutrina da não-especificidade” (PACAK *et al.*, 1998). Atualmente esse conceito sofreu algumas modificações em relação àquelas definidas por Selye. Por exemplo, o estudo de PACAK *et al.*, 1998, demonstrou que cada estressor tem sua própria “assinatura” neuroquímica central e neuroendócrina periférica. A resposta ao estresse seria um conjunto de respostas do organismo ao agente estressor. Esse agente estressor é descrito como algo que pode vir a perturbar a homeostase do organismo e, assim, requer uma resposta fisiológica. Pode também ser uma interpretação errônea da situação que é encarada como ameaça, e desencadeia uma resposta hormonal e/ou comportamental (McEWEN, 2002; TSIGOS & CHROUSOS, 2002).

Há dois sistemas de resposta ao estresse que são classicamente descritos na literatura: o sistema neurovegetativo, caracterizado pela liberação de adrenalina pela medula adrenal; e o sistema neuroendócrino, caracterizado pela liberação de

glicocorticóides (Gs), os quais são produzidos pelo córtex da glândula adrenal sob estímulo do hipotálamo e da hipófise (McEWEN, 2002; TSIGOS & CHROUSOS, 2002). A ativação aguda desses sistemas é altamente adaptativa, promovendo uma maior disponibilidade de energia e aporte sanguíneo aos órgãos-alvo (TSIGOS & CHROUSOS, 2002). Contudo, uma exposição prolongada aos Gs, causada pela ativação crônica desses sistemas, pode ter efeitos deletérios ao organismo (DALLMAN *et al.*, 2004; MILLER & O'CALLAGHAN, 2002).

## **1.2 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal**

Qualquer distúrbio no corpo, seja ele real ou imaginário, provoca uma resposta ao agente estressor, com a finalidade de manter a homeostase e facilitar a adaptação. Em mamíferos, esta resposta é desencadeada pelo eixo HHA.

Uma típica resposta neuroendócrina ao estresse envolve inicialmente, dentro de segundos, uma secreção aumentada de catecolaminas (CAs) (adrenalina e noradrenalina) pelo sistema nervoso simpático, ativação do Núcleo Paraventricular Hipotalâmico (PVN), onde importantes peptídeos são altamente expressos, como arginina-vasopressina (AVP) e o Hormônio Liberador da Corticotropina (CRH), e secreção aumentada de ocitocina (OT) pelo lobo neural da hipófise. Os axônios dos neurônios PVN projetam-se para a zona externa da eminência média do hipotálamo, o que leva à liberação dos peptídeos no sistema porta – uma estrutura vascular especializada que liga o sistema nervoso central (SNC) à glândula hipófise. Isto resulta na síntese e liberação de diversos outros peptídeos derivados de um precursor comum: a pró-opiomelanocortina (POMC). Entre estes peptídeos, estão incluídos os opióides endógenos, como a  $\beta$ -endorfina, e o Hormônio Adrenocorticotrópico

(ACTH), que, ao ser lançado na circulação sistêmica, é carregado até as glândulas adrenais onde ativa a produção e liberação de Gs pelo córtex das mesmas (DE KLOET *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 1992; SAPOLSKY *et al.*, 2000; VAN DE KAR & BLAIR, 1999).

O sistema HHA, que envolve a liberação de hormônios Gs pela adrenal (cortisol no homem e corticosterona no rato) é lento e persistente (DE KLOET *et al.*, 1998). Alguns minutos após o início da exposição do indivíduo ao estressor, há um aumento dos níveis de Gs plasmáticos, atingindo o pico entre 30 minutos e 1 hora (SAPOLSKY *et al.*, 2000). O eixo HHA é um dos principais sistemas de controle da resposta psicológica aos estressores nos mamíferos (O'BRIEN, 1997; SAPOLSKY *et al.*, 2000). Os hormônios Gs são os efetores finais do eixo HHA e participam no controle da homeostase e da resposta do organismo aos estressores (HABIB *et al.*, 2001). Esses hormônios têm ações de proteção da homeostasia, pois mobilizam estoques energéticos, resultando na estimulação do catabolismo protéico, da gliconeogênese e da lipólise; eles auxiliam na regulação do metabolismo protéico e do glicogênio e ajudam a estimular a formação de glicogênio em outros tecidos (PHILLIPS *et al.*, 2006). Além disso, melhoram a função cognitiva e inibem a secreção de esteróides gonadais (DE KLOET, 1998). Aumentos agudos nos níveis de Gs provocam uma resposta adaptativa e o aumento prolongado pode ter efeitos negativos no sistema nervoso, além de outros tecidos, e estão sendo associados à dilatação ventricular, atrofia cerebral, redução na capacidade cognitiva (O'BRIEN, 1997) e possível neurotoxicidade (SAPOLSKY, 2000a,b).

Os efeitos da corticosterona (CORT) são mediados por dois subtipos de receptores de Gs: o receptor mineralocorticóide (RM) o qual tem maior afinidade pela CORT e o receptor glicocorticóide (RG) que possui menor afinidade pela CORT (MEIJER & DEKLOET, 1998; MEIJER *et al.*, 1998). Os RMs participam do controle da excitabilidade

basal e da responsividade comportamental, enquanto que os RGs estão envolvidos no término da resposta ao estresse e na supressão da excitabilidade aumentada por estímulo excitatório (TRITOS *et al.*, 1999). Esses receptores também agem como fatores de transcrição dependentes de ligante (EVANS & ARRIZA, 1989; GESING *et al.*, 2001). Os RMs são encontrados em algumas áreas límbicas como o hipocampo, enquanto que os RGs são encontrados em várias regiões encefálicas, incluindo o córtex frontal e o PVN hipotalâmico (JACOBSON & SAPOLSKY, 1991; MEIJER & DEKLOET, 1998).

Os Gs têm um papel regulador chave no controle neuroendócrino do eixo HHA e no término da resposta ao estresse ao exercer retroalimentação negativa em receptores no hipotálamo, na hipófise e em estruturas do sistema límbico, tais como o hipocampo e a amígdala (DE KLOET *et al.*, 1986; DE KLOET, 1995; MEANEY *et al.*, 1996; MEIJER & DE KLOET, 1998; REUL *et al.*, 1990). A retroalimentação negativa tem dois modos de operação (VAN OERS *et al.*, 1998): o modo pró-ativo envolve a manutenção de níveis basais do eixo HHA – esse processo determina a sensibilidade ou limiar da resposta ao estresse e envolvem funções de RMs de alta afinidade por CORT localizados nas regiões encefálicas superiores; a função do modo reativo é de suprimir os níveis de ACTH e CORT induzidos por estresse – esse fenômeno envolve RGs de baixa afinidade localizados em neurônios parvocelulares do PVN; nas células corticotróficas hipofiseais, em abundância nas regiões corticais, no hipocampo e nas vias ascendentes aminérgicas, onde medeiam a influência modulatória da CORT na atividade do HHA. A ativação de RMs no hipocampo inibe a atividade do eixo HHA (GESING *et al.*, 2001). Eferências neuronais hipocampais ativam neurônios GABAérgicos localizados na região septal ventrolateral e no núcleo próprio da *stria terminalis* (BNST), os quais projetam-se para neurônios da região parvocelular do núcleo hipotalâmico paraventricular (HERMAN & CULLMAN, 1997). A

inibição realizada por esses hormônios atua como um limite na sua própria ação, o que previne efeitos catabólicos, antirreprodutivos e imunossupressivos no organismo (TSIGOS & CHROUSOS, 2002).

### **1.3 Gênero e Estresse**

A maior incidência de depressão e outros transtornos relacionados ao estresse em mulheres implicam numa maior sensibilidade dos sistemas ou substratos relacionados ao estresse no sexo feminino (CURTIS *et al.*, 2006). O encéfalo masculino ou feminino (seja humano, seja de roedor), difere, geralmente, em muitos níveis, anatomicamente, metabolicamente e neuroquimicamente e também nas respostas ativacionais a estímulo emocional (DUCHESNE *et al.*, 2009). Estudos clínicos têm mostrado que a função do eixo HHA é sexualmente dimórfica em ambas as condições normais e patológicas tais como o transtorno de depressão maior, já que as mulheres têm maiores níveis basais e induzidos por estresse de cortisol e são mais resistentes à supressão do eixo HHA por dexametasona (YOUNG, 1998; KLEIN & CORWIN, 2002; KUDIELKA & KIRSCHBAUM, 2005). Em ratos, diferenças sexuais têm sido demonstradas na função do eixo HHA e nas respostas a situações estressantes ou provocadoras de ansiedade (BLANCHARD *et al.*, 1991; KARANDREA *et al.*, 2000, 2002; BEIKO *et al.*, 2004; CURTIS *et al.*, 2006). Estudos com ratos demonstraram que há uma responsividade aumentada do eixo HHA em fêmeas, comparada aos machos (KIVVAT, 1961; CRITCHLOW *et al.*, 1963; LE MEVEL *et al.*, 1979; SEALE *et al.*, 2004), as fêmeas também têm maiores níveis plasmáticos basais e induzidos por estresse dos hormônios ACTH e CORT e tendem a mostrar mais comportamento exploratório (JOHNSTON & FILE, 1991; MENDELSON & McEWEN,

1991; VIAU & MEANEY, 1991; IMHOF *et al.*, 1993; BURGESS & HANDA, 1992; LUNGA & HERBERT, 2004). Um fator complicador na análise da contribuição da CORT à função neural de fêmeas é que os níveis de CORT não são constantes, mas variam ao longo do ciclo estral e os níveis são maiores no pró-estro (LUINE *et al.*, 2007). Deve ser considerado, entretanto, que a natureza do dimorfismo sexual do eixo HHA é mais complexa em humanos. Estudos sugeriram que os hormônios circulantes poderiam influenciar as diferenças sexuais de atividade do eixo HHA (MILLER *et al.*, 2004; SEALE *et al.*, 2004). Suportando esses achados, BURGESS & HANDA (1992) demonstraram que o estrogênio prejudica a retroalimentação negativa dos Gs. Sugere-se que a sensibilidade aumentada do eixo HHA em fêmeas está relacionada à indução da transcrição de CRH pelo complexo do receptor de estrogênio (VAMVAKOPOULOS & CHROUSOS, 1993; MILLER *et al.*, 2004). Esses achados são consistentes com a idéia de que os efeitos do estrogênio na transcrição do CRH (efeitos que são pré-sinápticos à hipófise) estão correlacionados com a resposta sexualmente dimórfica do eixo HHA. No entanto, as diferenças sexuais de resposta ao estresse, assim como nas respostas comuns ao estresse entre ambos os gêneros, não ocorrem somente no eixo HHA e nos hormônios circulantes, mas também em sistemas centrais de neurotransmissores (CURTIS *et al.*, 2006).

#### **1.4 Ocitocina e Estresse**

A OT é produzida principalmente pelo trato hipotálamo-neurohipófise. Neurônios magnocelulares dos núcleos supraóptico e paraventricular enviam seus axônios carregando o peptídeo através da camada interna da eminência média para o lobo posterior ou neural da glândula hipófise para liberá-la na circulação. Além disso, a OT liberada da neuro-hipófise



pode alcançar a adeno-hipófise via os plexos capilares compartilhados (JEZOVÁ *et al.*, 1995; CONSIGLIO, 2006). Além de sua presença no hipotálamo, a OT é encontrada em várias outras regiões encefálicas (por exemplo, no sistema límbico e no tronco encefálico), sugerindo que OT possui um papel na neurotransmissão. Nos animais, o sistema ocitocinérgico central é considerado por apresentar um papel em vários tipos de comportamentos. A OT também pode ser considerada um hormônio típico do estresse a qual pode estar envolvida no controle neuroendócrino das respostas ao estresse, podendo também estar envolvida em psicopatologias relacionadas ao estresse, tais como a depressão (JEZOVÁ *et al.*, 1995; CONSIGLIO, 2006). Uma variedade de estressores que estimulam o eixo HHA induz secreção de OT não apenas no sangue, mas também no encéfalo de machos e fêmeas (NEUMANN *et al.*, 2000). Ambos estressores osmóticos (administração de salina hipertônica) e não-osmóticos (imobilização por 30 min.) induzem liberação de OT. Foi encontrado que a liberação de OT em ratos também está aumentada em resposta a vários outros tipos de contenção ou imobilização, éter, hipoglicemia, nado forçado e aumento na temperatura ambiente (LANG *et al.*, 1983; GIBBS, 1984; CARTER & LIGHTMAN, 1986; HASHIMOTO *et al.*, 1989; IVÁNYI *et al.*, 1991; CRINE & BUJIS, 1987; HIGUCHI *et al.*, 1986; HIGUCHI *et al.*, 1990; BJÖRKSTRAND *et al.*, 1992; JEZOVÁ *et al.*, 1993; ROMERO *et al.*, 1993; VECSENYÉS *et al.*, 1994; JEZOVÁ *et al.*, 1995). Achados sugerem que a OT intracerebral pode estar envolvida no término das respostas ao estresse ou em processos adaptativos, ou ambos, quando há uma exposição recorrente ao estressor (PATCHEV *et al.*, 1993; LIBERZON & YOUNG, 1997). O efeito inibitório da OT intracerebral pode ser mediado não apenas pelo PVN, mas também por regiões límbicas tais como o hipocampo, amígdala e septo. Os achados de NEUMANN *et al.*, 2000, indicam que a OT inibe os neurônios do PVN que regulam a secreção de ACTH.

As ações intracerebrais da OT dependem dos níveis de esteróides sexuais circulantes. Estrogênios, por exemplo, potenciam a ação da OT pelo aumento de receptores funcionais de OT no encéfalo (PATCHEV *et al.*, 1993; YOUNG *et al.*, 1997a; DEKLOET *et al.*, 1985).

### **1.5 Neuroquímica da Resposta ao Estresse**

Múltiplas estruturas encefálicas e sistemas de neurotransmissores estão envolvidos na organização das respostas a estímulos aversivos ou estressantes (Figura 1). Entre elas estão: o hipotálamo, o sistema septo-hipocampal, amígdala, os córtices cingulado e pré-frontal, estruturas caudais tais como os grupos de corpos celulares catecolaminérgicos no tronco encefálico, o núcleo parabraquial, o núcleo cuneiforme e o núcleo dorsal da rafe (VAN DE KAR & BLAIR, 1999). A maioria das entradas sensoriais passa através do sistema reticular ou do tálamo, os quais funcionam como estações e retransmissão (*relay*), para a amígdala e córtex sensorial (AMIRAGOVA, 1985; KORTE *et al.*, 1992; PEZZONE *et al.*, 1992). O córtex sensorial então se comunica diretamente ou via o hipocampo com a amígdala lateral através do córtex perirrinal (DAVIS *et al.*, 1994a,b; LEDOUX, 1995). Neurônios CRH no PVN recebem entradas da amígdala central diretamente ou através do BNST (CULLINAN *et al.*, 1993; GRAY *et al.*, 1989, 1993; GRAY, 1993). Acredita-se que esta via amígdalo-hipotalâmica tenha um papel chave na resposta adrenocortical a uma série de estímulos somatossensoriais (FELDMAN *et al.*, 1975; GRAY, 1993; GRAY *et al.*, 1993). Neurônios CRH são estimulados por serotonina e acetilcolina e inibidos por Gs, ácido gama-aminobutírico (GABA), ACTH e peptídeos opióides (CALOGERO *et al.*, 1988; STRATAKIS & CHROUSOS, 1995).

Em adição a sua função neuroendócrina, o CRH pode agir como um neurotransmissor ou neuromodulador em circuitos extra-hipotalâmicos para integrar o sistema múltiplo encefálico de respostas ao estresse (PREIL *et al.*, 2001). Algumas das áreas envolvidas nessa regulação de CRH extra-hipotalâmica incluem o córtex, amígdala, núcleo *accumbens* (Nacc) e hipocampo (CARRASCO & VAN DE KAR, 2003). Ao agir como neurotransmissor em outras áreas encefálicas, tais como o BNTS, o núcleo dorsal da rafe e o *locus ceruleus*, o CRH pode modular a atividade dos sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos, respectivamente, de modo a coordenar os componentes vegetativos e comportamentais da resposta ao estresse (DUNN & BERRIDGE, 1987; CURTIS & VALENTINO, 1994; CURTIS *et al.*, 1995, 1999; PRICE *et al.*, 1998).

Diversos neurotransmissores participam das respostas centrais do estresse, tais como a indolamina serotonina e as catecolaminas (CAs) dopamina e noradrenalina – as quais também são conhecidas por monoaminas (BALDESSARINI, 1972; WEINER & GANONG, 1978; CARRASCO & VAN DE KAR, 2003). Mudanças neuroquímicas têm sido demonstradas em resposta a uma variedade de estressores, incluindo nado forçado (JORDAN *et al.*, 1994; PARIS *et al.*, 1987), medo condicionado (INOUE *et al.*, 1993; LORENS *et al.*, 1990), choque elétrico nas patas (DUNN, 1988a,b; INOUE *et al.*, 1994; SHANKS *et al.*, 1991) e imobilização (PARIS *et al.*, 1987; SHINTANI *et al.*, 1995). Essas alterações neuroquímicas induzidas por estressor incluem, de modo geral, aumentos na liberação e renovação (ou “*turnover*”, que é a relação de síntese e degradação de neurotransmissor, dado pela razão metabólito/neurotransmissor) da serotonina, dopamina e noradrenalina em uma variedade de regiões encefálicas (BALDESSARINI, 1972; CONNOR, 1997; JOCA *et al.*, 2007). Tais alterações têm sido detectadas usando análises

*postmortem ex vivo* (DUNN, 1988a,b; INOUE *et al.*, 1994) e estudos de microdiálise *in vivo* (JORDAN *et al.*, 1994; SHINTANI *et al.*, 1995).

Os mecanismos pelos quais estas monoaminas estão envolvidas no estresse serão detalhados a seguir.

### **1.5.1 Serotonina e Estresse**

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é uma indolamina amplamente distribuída no encéfalo e está envolvida no humor e no controle de impulso (FINK *et al.*, 1998; YOUNG *et al.*, 1996). Disfunção da neurotransmissão serotoninérgica tem sido associada a vários transtornos de humor e de ansiedade, incluindo depressão, transtorno de pânico, transtorno obsessivo-compulsivo e transtornos alimentares (GRAEFF *et al.*, 1997; LEVY & VAN DE KAR, 1992; MORA *et al.*, 1997). Desde a descoberta de que a inibição seletiva da recaptação de 5-HT induz efeitos antidepressivos, vários estudos têm investigado o papel da neurotransmissão serotoninérgica na neurobiologia da depressão (DELGADO *et al.*, 1990). Ademais, os neurônios serotoninérgicos têm uma grande influência na regulação da função neuroendócrina.

Os corpos celulares estão localizados nos núcleos dorsal ou medial da rafe, mas alguns estão localizados na região ventrolateral do mesencéfalo que é também conhecida por grupo celular B9 (DAHLSTROM & FUXE, 1965). Os neurônios serotoninérgicos localizados na rafe mesencefálica inervam o hipotálamo. Muitos desses neurônios também enviam colaterais à amígdala (PETROV *et al.*, 1994) e possivelmente a outras regiões límbicas prosencefálicas. Então, mudanças na eferência serotoninérgica a várias regiões

límbicas prosencefálicas pode ser refletido em mudanças na eferência serotonérgica ao hipotálamo (CARRASCO & VAN DE KAR, 2003).

As fibras imunorreativas a 5-HT que inervam o PVN estão concentradas na divisão parvocelular e são provenientes da rafe dorsal, rafe medial, e do grupo celular lateral (B9) do mesencéfalo (VAN DE KAR, 1991) – neurônios contendo CRH no PVN recebem aferência sináptica serotonérgica diretamente. Evidências reforçam a idéia de que o sistema serotonérgico central pode influenciar a atividade do eixo HHA via uma ação direta sobre os neurônios que sintetizam CRH (LIPOSITS *et al.*, 1987). Sugere-se, porém, que os neurônios 5-HT do núcleo dorsal da rafe e/ou seus terminais nervosos no hipocampo ou hipotálamo possam participar na retroalimentação inibitória da secreção de ACTH (VAN DE KAR, 1991).

A 5-HT parece exercer um papel protetor no hipocampo e atenua as conseqüências comportamentais do estresse pela ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> nesta estrutura (JOCA *et al.*, 2007). A ativação destes receptores hipocampais poderia ajudar na adaptação ao estresse pela atenuação do impacto emocional de estímulos aversivos e conseqüentemente inibindo a consolidação de memórias estressantes. Finalmente, o 5-HT<sub>1A</sub> medeia algumas ações tróficas atribuídas a 5-HT tais como aumento na neurogênese (BREZUN & DASZUTA, 1999; BREZUN & DASZUTA, 2000; RADLEY & JACOBS, 2002; BANASR *et al.*, 2004) e a liberação de fatores neurotróficos (GALTER & UNSICKER, 1996). É possível que esses efeitos poderiam proteger a circuitaria hipocampal de efeitos deletérios induzidos pela exposição repetida ao estresse e aos Gs. Os corticosteróides podem agir modulando diretamente a neurotransmissão serotonérgica pela regulação dos receptores 5-HT. A alta concentração de receptores corticosteróides no hipocampo está relacionada com a sensibilidade dos receptores 5-HT à regulação por corticosteróide nessa região. Ou seja, há

uma ligação funcional nas interações esteróide-receptor de 5-HT nessa estrutura (VÁZQUEZ *et al.*, 2002).

### **1.5.2 Dopamina e Estresse**

A dopamina (DA) é uma CA que apresenta um importante papel na regulação do humor e comportamento, particularmente no comportamento motivado e de recompensa. (KOOB, 1999; BERRIDGE & ROBINSON, 1998; HYMAN *et al.*, 2006). A DA também está implicada na neurobiologia da depressão e no mecanismo de ação dos antidepressivos (GAMBARANA *et al.*, 1995; D'AQUILA *et al.*, 2000; BASSO *et al.*, 2005; GERSHON *et al.*, 2006; NESTLER & CARLEZON, 2006). A hipofunção dopaminérgica nas rotas dopaminérgicas mesolímbicas está relacionada à motivação diminuída e/ou à anedonia observada em estados depressivos em humanos (NELSON & CHARNEY, 1981; CABIB & PUGLISI-ALLEGRA, 1996; WILLNER, 1997; D'AQUILA *et al.*, 2000; NESTLER & CARLEZON, 2006).

Estudos já relataram achados apoiando o papel da DA endógena na regulação da atividade do eixo HHA (BOROWSKY & KUN, 1991a,b,c; CASOLINI *et al.*, 1993), aparentemente mediada pelos receptores D<sub>1</sub> e D<sub>3</sub>, ao invés de D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> (BOROWSKY & KUHN, 1992). Durante o estresse, a liberação de DA mesocortical normalmente age de forma adaptativa pois está relacionada à capacidade de retroalimentação negativa prevenindo a ativação excessiva do eixo HHA (SULLIVAN & DUFRESNE, 2006).

A regulação dopaminérgica na função do eixo HHA parece ser mediada por neurônios dopaminérgicos do hipotálamo, os quais são distintos dos neurônios dopaminérgicos no prosencéfalo mediando a ativação comportamental (BOROWSKY &

KUHN, 1990, 1991c). Há um grupo de pericários contendo DA (identificados como A12) localizados nos núcleos arqueado e periventricular no hipotálamo medial (MOORE *et al.*, 1987). Esses neurônios formam o sistema Tuberoinfundibular (TI), o qual consiste de pequenos neurônios com corpos celulares nos núcleos do arqueado e projetam-se à camada externa da eminência média em próximo contato aos capilares que se unem para formar os vasos portais hipofiseais, e o sistema túbero-hipofiseal, o qual se projeta para os lobos neural e intermediário da hipófise. O PVN recebe inervação dopaminérgica de duas fontes principais: o núcleo dorsal periventricular (grupo A14) e da *zona incerta* (grupo A13) (CHEUNG *et al.*, 1998; WAGNER *et al.*, 1995). A parte magnocelular do PVN contém predominantemente neurônios que sintetizam AVP e OT (KOVACS, 1998). As observações anatômicas de que o D<sub>1</sub> está presente nesta subregião do PVN fornece evidência indicando que a liberação de AVP e OT pode estar sob controle direto de D<sub>1</sub>. Como já foi mencionado, a localização de D<sub>1</sub> não está limitado apenas à parte magnocelular do PVN; sua presença também pode ser observada na parte parvocelular, caracterizada pela presença de neurônios que sintetizam CRH (ARMSTRONG, 1995; KOVACS, 1998). A presença de D<sub>1</sub> na porção parvocelular é esperada, uma vez que foi observado que a ativação de D<sub>1</sub> por um agonista induziu o aparecimento de proteína cFos em neurônios positivos para CRH do PVN (EATON *et al.*, 1996). Além do hipotálamo, estudos já demonstraram o aumento da atividade dopaminérgica provocada por estresse em outras estruturas encefálicas, tais como o córtex pré-frontal (CPF), Nacc, estriado, tronco encefálico e amígdala, os quais recebem aferências de outros neurônios dopaminérgicos, tais como os da área tegmental ventral (VTA) e da substância *nigra* (DUNN, 1988a,b; DUNN & BERRIDGE, 1982; IMPERATO *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 1995; PIAZZA *et al.*, 1996; BRAKE *et al.*, 2000; SULLIVAN & DUFRESNE, 2006; DALLA *et al.*, 2008).

Em um estudo das diferenças de gênero na DA (DALLA *et al.*, 2008), foi observado que as fêmeas controle apresentavam uma atividade dopaminérgica basal aumentada, tendo uma maior renovação da DA (HVA/DA, DOPAC/DA) na maioria das regiões encefálicas estudadas (hipocampo, hipotálamo e CPF) comparado aos machos. A renovação de DA está aumentado no hipocampo de ratos machos submetidos ao estresse por nado forçado, porém, não em fêmeas. Há diferenças de gênero na neurotransmissão dopaminérgica basal e em resposta ao estresse, as quais poderiam estar relacionadas com os efeitos ativadores (durante a vida adulta) e/ou organizadores (durante o desenvolvimento) dos hormônios sexuais (THOMPSON & MOSS, 1997; SFIKAKIS *et al.*, 1998). Em outro estudo (DUCHESNE *et al.*, 2009), as fêmeas apresentaram níveis significativamente mais altos de DA no CPF ventromedial, córtex insular e Nacc. No entanto, os machos apresentaram maiores níveis de DOPAC ou renovação (DOPAC/DA) do que em fêmeas no CPF ventromedial, córtex insular, Nacc, amígdala e hipocampo dorsal, sugerindo uma maior utilização de neurotransmissor em machos.

### **1.5.3 Noradrenalina e Estresse**

O sistema noradrenérgico tem sido há muito tempo relacionado às respostas comportamentais ao estresse (LEONARD, 2001; MORILAK *et al.*, 2005) e ao mecanismo de ação das drogas antidepressivas (HENINGER *et al.*, 1996; BRUNELLO *et al.*, 2002; NUTT, 2006). A noradrenalina (NA, também chamada norepinefrina) é uma CA amplamente distribuída no encéfalo.

Diferentemente dos neurônios dopaminérgicos, os corpos celulares de todos os neurônios secretores de NA no encéfalo estão localizados na porção caudal do encéfalo.



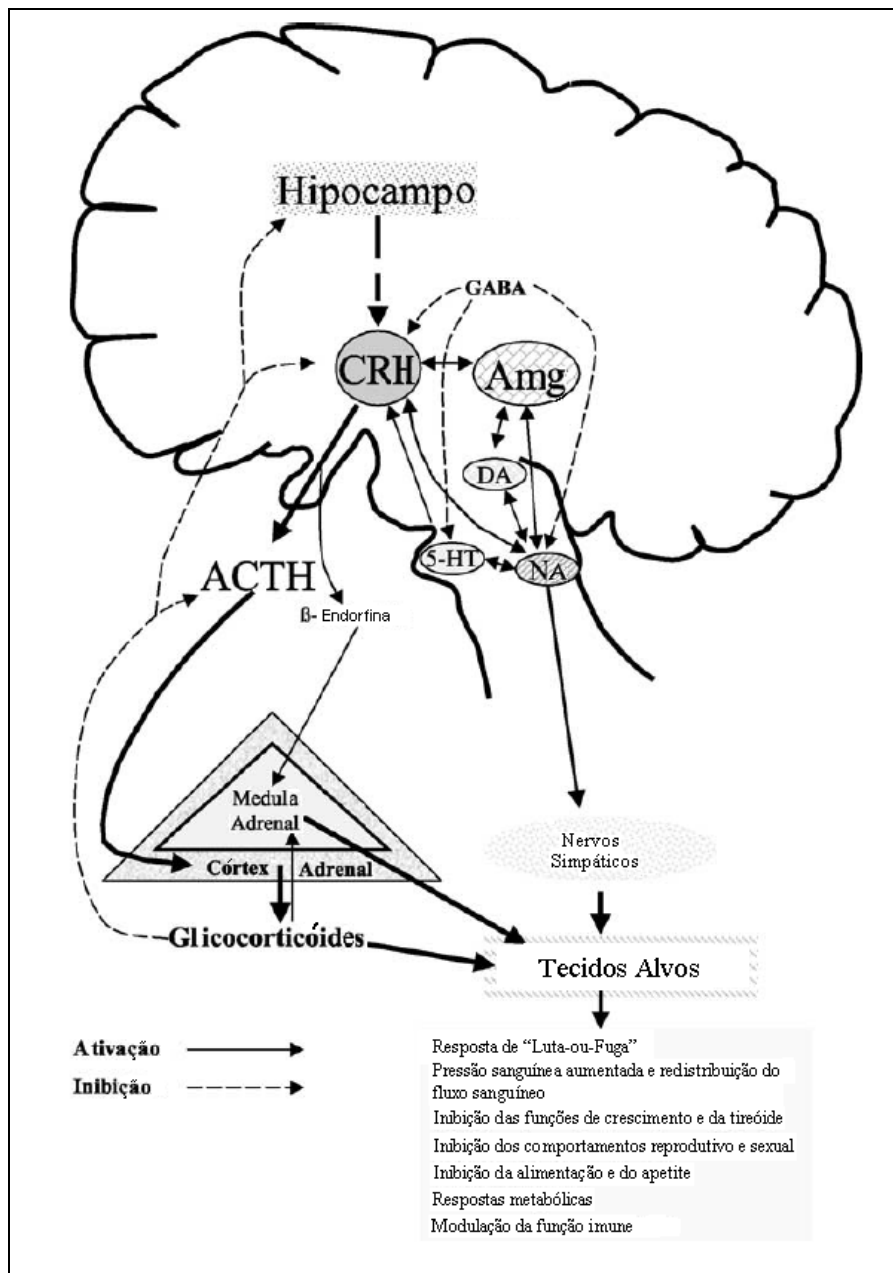
Seus axônios projetam-se para todas as partes do encéfalo e medula espinhal. Há três sistemas principais: o sistema *locus ceruleus* (LC) feito de neurônios no LC que se projetam para o cerebelo e medula espinhal via o feixe noradrenérgico dorsal para o prosencéfalo; o sistema tegmentar lateral feito de neurônios na porção lateral da medula, *locus subceruleus*, e áreas tegmentais laterais relacionadas que se projetam para a medula espinhal e via o feixe noradrenérgico para o tronco encefálico e hipotálamo; o sistema tegmental dorsal feito de neurônios na região do núcleo motor dorsal do vago e do trato solitário que provavelmente também se projetam para o tronco encefálico e hipotálamo via o feixe ventral noradrenérgico (WEINER & GANONG, 1978).

A NA encefálica é o principal sistema de alarme que leva à diminuição das funções neurovegetativas, tais como comer e dormir (HABIB *et al.*, 2001). A ativação do sistema NA-LC é uma resposta consistente ao estresse que pode funcionar para otimizar o estado de alerta e o uso da atenção para adaptação ao desafio (CHROUSOS & GOLD, 1992; O'CONNOR *et al.*, 2000; LEONARD, 2001; VERMETTEN & BREMNER, 2002; BERRIDGE & WATERHOUSE, 2003; VALENTINO & VAN BOCKSTAELE, 2005). Exposição a vários estímulos estressores resulta em um aumento total da atividade dos neurônios contendo NA, incluindo o LC (LACHAUER *et al.*, 1991; QUINTIN *et al.*, 1987; QUINTIN *et al.*, 1989). A ativação geral dos neurônios noradrenérgicos tem sido descrita em resposta a diferentes estressores (barulho, contenção, hipoglicemia, nado) em ratos e em gatos (ABERCROMBIE & JACOBS, 1987a,b, 1988; CASSENS *et al.*, 1980, 1981; CURTIS *et al.*, 1997; MORILAK *et al.*, 1987). Estímulos de intensidade suficiente (por exemplo, contenção) podem causar aumentos na atividade de neurônios LC em associação com ativação simpática (aumento na taxa cardíaca, por exemplo) (ELAM *et al.*, 1984; REINER, 1986; AMBERCROMBIE & JACOBS, 1987). Vários tipos de estressores físicos

tais como exaustão muscular (GORDON *et al.*, 1966), imobilização (CORRODI *et al.*, 1968), frio (GORDON *et al.*, 1966) e choque elétrico (THIERRY *et al.*, 1968) induzem aceleração da renovação de NA central. A renovação (MHPG/NA) aumentada do metabolismo da noradrenalina foi também descrito durante a exposição ao estresse em ratos, como por exemplo, choque nas patas (THIERRY *et al.*, 1968; KORF *et al.*, 1973). As razões MHPG/NA estão aumentadas por estresse em diversas regiões, tais como no CPF, no Nacc, no septo, na amígdala, no hipotálamo, no hipocampo e no tronco encefálico (DUNN, 1988a).

O hipotálamo sendo um importante centro integrativo da resposta neuroendócrina também recebe inervação de neurônios contendo NA (HABIB *et al.*, 2001). Os neurônios noradrenérgicos que inervam o PVN hipotalâmico têm sua origem no núcleo caudal do trato solitário (grupo celular A2) na porção dorsolateral da medula, com algumas contribuições do grupo celular medular A1 e do LC (A6) (CUNNINGHAM & SAWCHENKO, 1988; HABIB *et al.*, 2001; PALKOVITS *et al.*, 1999; PALKOVITS, 1999). A divisão parvocelular do PVN é inervada principalmente pelos grupos celulares A2/C2 – acredita-se que neurônios nesta porção regulam a liberação de ACTH durante o estresse (LACHUER *et al.*, 1991; PLOTSKY, 1987). A divisão parvocelular também contém terminais noradrenérgicos e adrenérgicos em células imunorreativas para CRH, sugerindo um papel das CAs na regulação das respostas hipófise-adrenocorticais (LIPOSITS *et al.*, 1986; NALAI *et al.*, 1986; PLOTSKY, 1987). O estresse psicológico aumenta a renovação de NA preferencialmente no hipotálamo e também na amígdala (IIMORI *et al.*, 1982). Em outro trabalho também utilizando imobilização como estressor, foi indicado que este procedimento leva à liberação, recaptção, metabolismo e síntese de NA aumentados no PVN de ratos conscientes (PACAK *et al.*, 1992).

O hipocampo apresenta um importante papel na regulação do comportamento emocional e na função visceral (por exemplo, no controle do estresse), e pode estar relacionado ao controle das respostas cardiovasculares e respiratórias (ANAND & DUA, 1956; RUIT & NEAFSEY, 1990; RUIT & NEAFSEY, 1988). GRAY, 1981, relatou que a entrada noradrenérgica via feixes dorsais para o sistema mesencéfalo-hipocampo é importante para a indução da ansiedade. O hipocampo, o qual recebe extensiva inervação do LC (SWANSON *et al.*, 1987) e contém uma alta densidade de sítios de ligação (*binding*) de  $\alpha_2$ -adrenoceptores (BROWN *et al.*, 1990; CURET & DE MONTIGNY, 1988, 1989; CURET *et al.*, 1987) está implicado numa variedade de funções as quais relacionam o estímulo ambiental com respostas neuroendócrinas e cardiovasculares (McEWEN *et al.*, 1987; McEWEN *et al.*, 1992). Já está bem documentado que o estresse induz aumentos marcantes de liberação e síntese de NA no hipocampo (BRITTON *et al.*, 1992; NISEMBAUM & ABERCROMBIE, 1992; NISEMBAUM *et al.*, 1991; POL *et al.*, 1992; TANAKA *et al.*, 1989) e que  $\alpha_2$ -adrenoceptores modulam a atividade da NA em resposta ao estresse nesta área (ABERCROMBIE *et al.*, 1988; NISEMBAUM & ABERCROMBIE, 1993).



**Figura 1:** Circuitos encefálicos participando da regulação da resposta neuroendócrina do estresse. CRH= hormônio liberador de corticotropina no núcleo paraventricular do hipotálamo; 5-HT= serotonina no núcleo dorsal da rafe; NA= noradrenalina no *locus ceruleus*; DA= dopamina no sistema mesolímbico; Amg= amígdala. Adaptado de CARRASCO & VAN DE KAR, 2003.

## 1.6 Respostas ao Estresse no Período Neonatal

Nos roedores em desenvolvimento há um período entre os dias 4 e 14 de vida pós-natal no qual a resposta da adrenal ao estresse é mínima ou inexistente. Esse foi designado como o “Período Hiporresponsivo ao Estresse” (PHRE) (VÁZQUEZ, 1998; LEVINE, 2001). Esse período tem por característica o mecanismo de retroalimentação negativa aos Gs exacerbado no hipotálamo e na hipófise, sensibilidade da adrenal ao ACTH reduzida e elevações mínimas da CORT em resposta a maioria dos estressores (SUCHECKI *et al.*, 1995; SILVEIRA *et al.*, 2007). Há evidência que esse período hiporresponsivo também exista em humanos (SILVEIRA *et al.*, 2007). Durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal dos roedores, os níveis de CORT, de ACTH e de CRH estão diminuídos (VÁZQUEZ, 1998; LEVINE, 2001). Este estágio neonatal de hiporresponsividade do HHA poderia ser considerado um mecanismo adaptativo e protetor, uma vez que níveis elevados de corticosteróide durante este período crítico e anabólico do desenvolvimento têm efeitos profundamente deletérios e catabólicos que incluem a inibição do crescimento encefálico, da divisão celular dos neurônios, do desenvolvimento dos dendritos e do metabolismo neuronal (MEANEY *et al.*, 1985).

Os RGs são expressos no tecido encefálico do rato e é funcional no dia embrionário (E) 13; a regulação da retroalimentação negativa do eixo HHA por CORT está estabelecida entre E13 e E17 (KITRAKI *et al.*, 1996) e mudanças no nível de CORT no soro em filhotes neonatais podem afetar o nível de receptores de CORT, especialmente de RG (ANGELUCCI *et al.*, 1983).

As concentrações plasmáticas de ACTH e CORT são altas durante o 1º dia após o nascimento (P0) e diminuem pronunciadamente no 2º dia pós-parto (P1). Os níveis de

ACTH e CORT plasmáticos são baixos durante as primeiras duas semanas de vida e aumentam depois para alcançar valores semelhantes aos adultos no P21 (CHATELAIN *et al.*, 1988). Os conteúdos de ACTH na hipófise e de CRH no hipotálamo são baixos nas primeiras duas semanas e aumentam após esse período (BARTOVÁ, 1968). A diminuição dos valores plasmáticos de CORT é muito mais pronunciada do que de ACTH, sugerindo que o desenvolvimento da adrenal do rato é menos sensível ao efeito estimulatório da ACTH hipofiseal. A imaturidade da glândula adrenal do rato em desenvolvimento é consecutiva à baixa síntese e/ou secreção de ACTH pela hipófise durante o mesmo período. Alternativamente, a hipófise anterior pode ser menos sensível ao efeito estimulatório do CRH e da AVP. A síntese e secreção diminuídas de CRH poderiam ser consecutivas de uma retroalimentação negativa aos Gs aumentada - sugere-se que a regulação da expressão do gene CRH hipotalâmico não seja madura durante a primeira semana de vida (WALKER *et al.*, 1986).

Quanto à hipófise, alguns pesquisadores (SALKY & KOCH, 1981) demonstraram que durante as primeiras duas semanas de vida, até uma pequena percentagem de saturação dos RGs da hipófise pode estar associada com um alto grau de inibição da liberação de ACTH. Durante o PHRE, os níveis da globulina ligante de CORT são baixos no plasma e na hipófise anterior. Então, a circulação da CORT não-ligada é alta e pode ter acesso aos tecidos, especialmente aos corticotrofos, os quais podem contribuir para a sensibilidade aumentada da retroalimentação durante esse período. Os Gs podem também agir em um nível supra-hipofiseal para inibir a síntese e/ou secreção de CRH e AVP (GRINO *et al.*, 1991). Acredita-se que baixos níveis de Gs circulantes durante as duas primeiras semanas de vida sejam essenciais para o desenvolvimento normal encefálico e comportamental. Ratos tratados com Gs durante a primeira semana de vida têm permanentemente pesos

encefálicos reduzidos, alterações neuronais, gliais e de mielina, bem como mudanças comportamentais (SAPOLSKY & MEANEY, 1986). No final da segunda semana de vida o sistema HHA amadurece, com aumento gradual da CORT basal, responsividade ao estresse e emergência gradual da ritmicidade circadiana (MEANEY *et al.*, 1985).

A exposição a estímulo ou estresse durante esses primeiros dias determina alterações neuroquímicas e comportamentais que podem ser observadas ao longo da vida. Embora “hiporresponsivos”, esses indivíduos respondem agudamente ao estresse de serem separados de suas mães mesmo quando não expostos a nenhum outro estressor adicional (KUHN *et al.*, 1990), e essa resposta aumenta progressivamente nas 24h subseqüentes. Além disso, durante essa fase, os níveis de transcortina (proteína transportadora de G) são muito baixos e a maioria dos Gs circula no plasma nas suas formas não-ligadas e, então, na forma biologicamente ativa (HENNING, 1978; HADJIAN *et al.*, 1975). Logo, apesar da concentração plasmática total ser baixa durante o PHRE, a concentração de sua forma biologicamente ativa é alta, sendo suficiente para o hormônio efetuar suas ações biológicas e possivelmente agir como um programador do SNC de forma duradoura.

### **1.6.1 Aspectos Ontogenéticos das Monoaminas**

As monoaminas têm um papel fundamental no desenvolvimento, modulação do padrão comportamental em mecanismo neural e na maturação das respostas elétricas (AGRAWAL *et al.*, 1966). Os níveis encefálicos de 5-HT e NA são baixos no rato recém-nascido, aumentando progressivamente com a idade, principalmente, durante a ontogenia pós-natal – até que os níveis adultos sejam atingidos pela quinta e sexta semana de vida pós-natal. A DA, por outro lado, continua a aumentar até a vida adulta. No nascimento, os

níveis encefálicos de 5-HT, DA e NA são 48%, 30% e 16% dos níveis adultos, respectivamente. As percentagens de mudanças em relação ao nível adulto de DA no encéfalo comparado à NA são mais baixas em todos os estágios do desenvolvimento, exceto no nascimento, onde os níveis absolutos de DA são maiores do que os de NA (AGRAWAL et al., 1966). No nascimento, as vias presumivelmente contendo DA são mais desenvolvidas do que àquelas contendo NA e 5-HT, e a proliferação dos terminais axonais ocorre em diferentes índices em diferentes partes do SNC (LOIZOU, 1972). O índice de aumento da concentração de monoaminas difere entre as regiões do encéfalo do rato em desenvolvimento. Os baixos níveis de monoaminas no rato recém-nascido parecem resultar de uma baixa capacidade de síntese e armazenamento (KARKI *et al.*, 1962). Apesar da ocorrência de níveis altos de precursores de monoaminas no recém-nascido, tais como triptofano e tirosina, as suas biosínteses podem estar prejudicadas como resultado da baixa atividade das enzimas hidroxilantes, tais como a triptofano hidroxilase e a tirosina hidroxilase (LOIZOU, 1972). É sugerido também que haja uma baixa atividade da monoamina oxidase (MAO) e da catecol-O-metil-transferase (COMT) no período neonatal e não parece haver diferença dessas enzimas de uma área para outra no desenvolvimento (PORCHER & HELLER, 1972).

O aumento no conteúdo de monoaminas do encéfalo para os níveis adultos durante as primeiras semanas de vida pós-natal ocorre concomitantemente com a maturação morfológica dos neurônios contendo monoaminas, tais como o aumento de volume dos corpos celulares e proliferação do aparato dos terminais axonais, com um aumento concomitante na quantidade (massa protéica) e atividade das enzimas sintetizadoras e um aumento no número de vesículas de armazenamento, ambos os quais eventualmente concentram-se nos terminais. O número adulto de corpos celulares é atingido na segunda



semana pós-natal. Embora os ratos neonatos possuam o número adulto de corpos celulares contendo monoaminas, eles não contêm o número adulto de terminais nervosos contendo monoaminas. É provável que a proliferação do aparato do terminal axonal forneça o substrato morfológico do aumento neuroquímico observado nas monoaminas, uma vez que no animal adulto a maioria da monoamina intracelular está localizada nas varicosidades terminais de ambos os neurônios periféricos e centrais contendo monoaminas. A proliferação dos terminais axonais é muito marcante durante as 3 primeiras semanas pós-natais no caso dos neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos, e durante as primeiras 4 semanas em neurônios dopaminérgicos. Depois disso, a proliferação cessa ou diminui consideravelmente (LOIZOU, 1972).

Dado que a desregulação da 5-HT está ligada tanto a transtornos autistas quanto a transtornos de humor na infância, achados quanto à ontogenia do sistema serotoninérgico têm implicações para o papel do estresse no início da vida na saúde mental na infância (KOSTEN *et al.*, 2004). O sistema serotoninérgico apresenta um padrão de desenvolvimento predominantemente pós-natal (VÁZQUEZ *et al.*, 2002). O padrão de localização regional do conteúdo de 5-HT no neonato é o mesmo que no adulto e o aumento no seu conteúdo é fraco em todas as regiões, sendo que o diencefalo apresenta um índice de aumento relativamente alto (NOMURA *et al.*, 1976). Os corpos celulares contendo 5-HT estão presentes no nascimento, mas aumentam em número, alcançando uma densidade máxima no final da segunda semana de vida (VÁZQUEZ *et al.*, 2002).

No início da vida, além do telencefalo, quantidades consideráveis de DA são encontradas no mesencefalo e diencefalo, tais como no núcleo central da amígdala e na eminência média do hipotálamo, os quais são ricos em terminais dopaminérgicos, bem como os corpos celulares dos grupos A8-10, os quais também são ricos em DA (LOIZOU,

1972). A renovação de DA aumentada no início da vida pode ser devido ao fato de que a regulação da retroalimentação da DA no estriado, mesencéfalo, hipotálamo e sistema límbico não esteja totalmente operante durante esse período da vida pois os contatos sinápticos são conhecidos por desenvolverem-se totalmente apenas no curso do período pós-natal. Os sítios dos receptores de DA, provavelmente imaturos no nascimento, são tidos por estarem envolvidos na regulação da renovação da DA. A responsividade dos receptores de DA e/ou neurônios envolvidos no mecanismo de retroalimentação aumenta gradualmente durante a vida pós-natal (KELLER *et al.*, 1973). O desenvolvimento ontogenético tanto da DA quanto de seus receptores ocorre pós-natalmente e é completo pela quarta semana de vida do rato e também já ocorre um controle neuroquímico da DA sobre o eixo HHA neste período (KITCHEN *et al.*, 1988). O rápido aumento dos receptores dopaminérgicos no início do desenvolvimento evidentemente corresponde a um período crítico de inervação e crescimento de aferências produtoras de monoaminas também especialmente robustas (TARAZI *et al.*, 1999). Uma vez que a DA é essencialmente formada da DOPA no SNC devido à atividade da enzima DOPA descarboxilase, é possível que um aumento repentino na concentração da DA depois de 15 dias de idade possa refletir o aumento da atividade enzimática (AGRAWAL *et al.*, 1966). Quanto aos metabólitos da DA, é observado durante o período pós-natal um aumento contínuo de DOPAC em todo o encéfalo, enquanto que as concentrações de HVA apresentam um pico entre P12 e P18 e depois disso sua concentração declina até que os níveis adultos sejam alcançados entre os dias 30 e 60 (KELLER *et al.*, 1973).

Conforme já mencionado, o conteúdo de NA encefálica é baixo no nascimento e aumenta progressivamente em todas as regiões do encéfalo, sendo que há um grande aumento no diencéfalo, enquanto que a parte inferior do tronco encefálico apresenta o

maior índice de aumento de NA durante 14 dias pós-natais. Nesse período crítico a NA pode ser sintetizada ativamente nos corpos celulares dos neurônios noradrenérgicos localizados no LC (NOMURA *et al.*, 1976). A hiperfunção noradrenérgica do LC no rato antes do P10 é responsável pelo aprendizado de uma preferência olfatória rápida e robusta por seu cuidador (MORICEAU & SULLIVAN, 2005).

Todos esses processos de maturação, juntamente com desenvolvimento dos níveis dos receptores e dos sistemas de retroalimentação dos neurotransmissores, podem afetar a renovação das monoaminas (KELLER *et al.*, 1973).

### **1.7 Interação Mãe-Filhote**

Uma forte ligação da prole jovem com o provedor é crítica para a sobrevivência em espécies cujos filhotes nascem muito imaturos e dependentes, incluindo os humanos (MORICEAU & SULLIVAN, 2005). A mãe apresenta um conjunto de mudanças fisiológicas, muitas dessas estimuladas pelos próprios filhotes – tais como o estímulo de sucção, por exemplo – de modo a cuidar de sua prole e garantir sua sobrevivência (GIOVENARDI *et al.*, 2000; MIRANDA-PAIVA *et al.*, 2003; WALKER *et al.*, 2004). O cuidado materno-filial pode ser estudado ao examinar os componentes do cuidado materno, os quais incluem a construção de ninho, lambe e afagar os filhotes e cobri-los com o corpo. A relação mãe-filhote é tipicamente tida como simbiótica. Em roedores, o comportamento de amamentação que ocorre entre a mãe e seus filhotes recém-nascidos envolve a participação de ambos os membros. Quando separados de suas mães, os filhotes sinalizam para a mãe recolhê-los através de dicas olfativas, visuais e auditivas. Após a mãe recolher seus filhotes para o ninho, ela então os cobre com o corpo e os lambe (WILKINS *et al.*,

1997). O comportamento de lambida tipicamente envolve lambar a região anogenital do filhote, o qual é benéfico para ambos a mãe e o filhote (GUBERNICK & ALBERTS, 1983). Os filhotes são participantes ativos na interação da lambida, mas os machos são lambidos mais do que as fêmeas, talvez porque eles respondem mais rapidamente à estimulação materna do que as fêmeas, ou porque eles têm um odor diferente das fêmeas (MOORE & MORELLI, 1979; MOORE & CHADWICK-DIAS, 1986).

A OT facilita a iniciação do cuidado materno em ratos e ovelhas (INSEL & YOUNG, 2000). A OT originada do PVN ou do núcleo supraóptico (SON) pode agir nos receptores de OT por todo o encéfalo para promover responsividade materna. A estimulação feita pelos filhotes não só influencia o comportamento materno, mas também a responsividade da mãe ao estresse (WALKER *et al.*, 2004).

As interações filhote-mãe requerem circuitos de aproximação social e de motivação intactos. Os sistemas ocitocinérgico e opióide estão envolvidos na motivação do filhote de camundongo em procurar contato social com sua mãe, talvez também agindo através de circuitos de recompensa no encéfalo (YOUNG *et al.*, 1997b; MOLES *et al.*, 2004). Quanto a estudos com ratos, foi sugerido que principalmente até o 10º dia pós-parto, os filhotes apresentam uma circuitaria neural peculiar adaptada a desenvolver um forte apego pela mãe, não importando a qualidade de cuidado materno recebido (MORICEAU & SULLIVAN, 2005). Filhotes de ratos que foram lambidos e afagados frequentemente por suas mães apresentam liberação de OT (PEDERSEN & BOCCIA, 2002). Há evidência de que a OT endógena durante o período neonatal tenha efeitos organizadores na expressão do comportamento adulto. O sistema serotoninérgico nos filhotes, via receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>1B</sub>, é responsável pela resposta vocal à separação da mãe (INSEL & WINSLOW, 1998). O sistema dopaminérgico neonatal pode ter um papel importante na mediação do

comportamento do filhote e nas interações mãe-filhote (WILKINS *et al.*, 1997). Já foi proposto que as monoaminas, particularmente a NA, têm um papel crucial no desenvolvimento do apego de um filhote pela sua mãe (KRAEMER, 1992; MORICEAU & SULLIVAN, 2005).

A presença materna tem um papel importante na regulação do eixo HHA (SUCHECKI *et al.*, 1995), o que pode ser observado nos experimentos de separação materna. A expressão da retroalimentação reativa ao estresse é em parte regulada pela interação mãe-filhote, e é prejudicada em filhotes com privação materna (VAN OERS *et al.*, 1998). Uma das conseqüências da interação mãe-filhote é a inibição funcional das vias neurais que são responsáveis pela ativação da cascata neuroendócrina requerida para evocar uma resposta do ACTH (VAN OERS *et al.*, 1998).

### **1.8 Eventos Ambientais no Início da Vida**

A primeira semana de vida pós-natal em roedores é um período crítico durante o qual experiências ambientais podem regular finamente a sensibilidade e eficiência do eixo HHA. Os efeitos de certos estímulos ambientais experienciados durante o desenvolvimento podem persistir através da vida do animal especialmente se tais estímulos ocorreram durante este período de sensibilidade máxima (LABAN *et al.*, 1995; ROTS *et al.*, 1996).

O cuidado parental tem um papel importante no desenvolvimento emocional e cognitivo da prole (KAFFMAN & MEANEY, 2007). Em humanos, adversidade ambiental ocorrendo no início do desenvolvimento está associada com um risco aumentado de doenças físicas e de transtornos psiquiátricos na vida adulta. As experiências de abuso infantil, negligência ou até mesmo de um vínculo pobre com seus provedores têm sido

demonstradas por aumentar os índices de diabetes e doença cardiovascular (BATEN *et al.*, 2004; GOODWIN & STEIN, 2004), tão bem quanto aumentar a suscetibilidade a transtornos relacionados à ansiedade (PHILLIPS *et al.*, 2005), à depressão (BATEN *et al.*, 2004), ao abuso de droga (DUBE *et al.*, 2003; ANDA *et al.*, 2006) e à esquizofrenia (READ *et al.*, 2005; RUTTER *et al.*, 2006). Entretanto, experiências aversivas no início da vida não apenas têm conseqüências negativas para o adulto, mas também têm mais repercussões imediatas na criança. Sabe-se que crianças abusadas, assim como crianças as quais experienciaram uma perda recente de um dos pais, apresentam precocemente altos índices de depressão, ansiedade e comportamento suicida (VÁZQUEZ *et al.*, 2002). O estudo de FRIES *et al.*, 2005, com crianças criadas em orfanatos, indica que os sistemas de neuropeptídeos de vasopressina e de OT, os quais são críticos no estabelecimento de vínculos sociais e na regulação de comportamentos emocionais, são afetados pela experiência social precoce. Os níveis de OT em crianças criadas por uma família aumentam após contato físico com suas mães, enquanto que crianças as quais experienciaram negligência precoce não apresentam essa resposta após contato físico com suas mães. Por outro lado, um bom vínculo entre o provedor e a prole é associado com aumento da resiliência ao estresse. O interesse moderno no impacto da separação materna ou negligência no comportamento humano pode ser traçado por dois seguidores de Sigmund Freud – Rene Spitz e John Bowlby – os quais descreveram crianças criadas em orfanatos ou por cuidados inconsistentes como tendo o risco de apresentar transtornos emocionais e sociais (CARTER, 2005).

Há diversos paradigmas de regulação ambiental no desenvolvimento neural, tais como a manipulação neonatal, a separação materna, o isolamento social e as variações naturais de cuidado materno. O procedimento de manipulação envolve um período breve

(1, 3 ou até 15 min) diário de separação dos filhotes de suas mães. Foi observado que as mães de filhotes manipulados lambiam seus filhotes significativamente mais freqüentemente do que as mães de ninhadas controles. Então, sugeriu-se que os efeitos da manipulação neonatal são mediados via a mãe – a manipulação de filhotes modifica a interação mãe-filhote, causando uma mudança no comportamento maternal (DENENBERG, 1999). O paradigma de separação materna, envolvendo horas de separação diária dos filhotes da mãe tem efeitos a curto e a longo prazo na responsividade do eixo HHA. A separação materna pode ser considerada um estressor fisiológico devido às prolongadas interrupções das influências maternas regulatórias (McCORMICK *et al.*, 2002). O isolamento neonatal – no qual cada filhote é isolado da mãe e de seus irmãos de 5 até 30 min – é tido como um estressor psicológico (McCORMICK *et al.*, 2002), um estressor o qual é dependente da falta de dicas familiares e então diferente de ambos os paradigmas de manipulação e separação materna. A seguir será descrita a abordagem das variações naturais de cuidado materno, a qual foi usada neste trabalho.

### **1.9 Variações Naturais de Cuidado Materno**

Outra abordagem para estudar a influência das interações mãe-filhote na neurobiologia e comportamento vem do estudo das diferenças individuais no cuidado materno. Durante a primeira semana pós-parto, ratas e camundongas lactantes mostram altos níveis de amamentação e contato com os filhotes acompanhado por séries de lambidas com freqüência desses comportamentos variando ambos dentro e entre as linhagens (SHOJI & KATO, 2006; CHAMPAGNE *et al.*, 2003a). Entre humanos, primatas e roedores, fêmeas demonstram variação considerável na quantidade e qualidade de cuidado que elas

forneem a suas proles (FAIRBANKS, 1989; BERMAN, 1990; FLEMING *et al.*, 1997; CHAMPAGNE *et al.*, 2003a; URIARTE *et al.*, 2007) e demonstram o mesmo nível de estabilidade ao longo do tempo. Essa variabilidade pode ser usada num desenho longitudinal para predizer o fenótipo na vida adulta (CHAMPAGNE & CURLEY, 2009). Essas diferenças se refletirão na ansiedade, no comportamento defensivo, na reatividade ao estresse, no comportamento social, no comportamento agressivo, no aprendizado e até mesmo no comportamento sexual (BRAKE *et al.*, 2004; CAMERON *et al.*, 2005; MENARD & HAKVOORT, 2007; URIARTE *et al.*, 2007).

O papel das diferenças individuais do comportamento de lambida (*licking/grooming*) das mães em modular a expressão gênica, a fisiologia e o comportamento de suas proles tem sido explorado extensivamente em ratos da linhagem *Long Evans* (MEANEY, 2001). Entre as ratas lactantes *Long Evans* há consideráveis variações na frequência na qual as mães dedicam-se a lambar os filhotes durante a primeira semana pós-parto e o comportamento de lambar é um comportamento distribuído de forma normal (CHAMPAGNE *et al.*, 2003a,b). Recentemente essa variação também foi encontrada em ratas da linhagem Wistar em nosso grupo de pesquisa (URIARTE *et al.*, 2007). Portanto, ao selecionar fêmeas que se dedicam ao comportamento de lambida que está 1 desvio padrão abaixo (*Low LG*, ou “Pouco-cuidadoras”) ou acima (*High LG* ou “Muito-cuidadoras”) da média da coorte é possível comparar dois grupos de proles que experienciaram uma diferença de 2 a 3 vezes no cuidado materno. Estudos iniciais demonstraram uma associação entre os níveis de lambidas e responsividade ao estresse, com a prole adulta de machos de mães Muito-cuidadoras (MC) sendo mais exploradores em um ambiente novo, tendo reduzidos ACTH e CORT plasmáticos em resposta ao estresse, elevados níveis de ARNm de RGs hipocâmpais, elevados níveis hipotálâmicos de



ARNm de CRH, e densidade aumentada de receptores benzodiazepínicos na amígdala comparados à prole de mães Pouco-cuidadoras (PC) (CALDJI *et al.*, 2000; FRANCIS *et al.*, 1999a; LIU *et al.*, 1997, 2000). A sobrevivência neural está aumentada e a apoptose está diminuída no hipocampo entre as proles MCs associado com elevados níveis de fator de crescimento de fibroblasto (BREDY *et al.*, 2003; WEAVER *et al.*, 2002). A liberação dopaminérgica associada com responsividade ao estresse em machos e recompensa em fêmeas está também alterada como uma função no comportamento de lambida (ZHANG *et al.*, 2005; CHAMPAGNE *et al.*, 2004). É importante acrescentar que estudos com adoção cruzada demonstraram que essas mudanças no fenótipo da prole estão relacionadas ao nível de cuidado recebido pós-parto e não a fatores genéticos ou pré-natais (CHAMPAGNE *et al.*, 2003a; FRANCIS *et al.*, 1999b). Em muitos aspectos, as proles de MCs e PCs são comparáveis aos animais manipulados e não manipulados no período neonatal, respectivamente (LIU *et al.*, 1997; CALDJI *et al.*, 1998; SULLIVAN & DUFRESNE, 2006).

As variações naturais no comportamento materno também são transmitidas através das gerações. A prole fêmea de mães MC exibirá altos níveis de lambidas para com seus próprios filhotes, enquanto a prole de mães PC também apresentará menores níveis de lambidas em relação às suas crias (CHAMPAGNE *et al.*, 2003a; FRANCIS *et al.*, 1999b; FLEMING *et al.*, 2002). A prole fêmea PC exibe diminuição na ligação do receptor de OT mediado por estrogênio e na imunorreatividade ao c-fos em regiões hipotalâmicas implicadas no cuidado materno tais como a área pré-óptica (POA) medial (CHAMPAGNE *et al.*, 2001; 2003b; FRANCIS *et al.*, 2000; 2002). Essa sensibilidade pode ser mediada pelos níveis diminuídos de ARNm para o receptor  $\alpha$  de estrogênio na POA medial os quais são encontrados em PC comparados aos MC (CHAMPAGNE *et al.*, 2003b; 2006). Análise

temporal desses receptores na POA medial indica que níveis diferenciados de ARNm para o receptor  $\alpha$  de estrogênio já são observados nos filhotes e são mantidos na vida adulta. As mães MC e PC também se diferem na atividade dopaminérgica mesolímbica associada com as interações mãe-filhote. As mães MC apresentam níveis elevados de receptores D<sub>1</sub> e D<sub>3</sub> no Nacc (CHAMPAGNE *et al.*, 2004). Tais diferenças podem servir como substratos neurais das diferenças individuais no componente motivacional do comportamento materno.

O modelo o qual avalia as diferenças naturais no cuidado materno entre ratos é um exemplo interessante da interação entre genes e ambiente com relação ao eixo HHA. Tem sido sugerido que a estimulação tátil pelo cuidado da mãe age por meio das vias serotoninérgicas ascendentes do núcleo da rafe (SMYTHE *et al.*, 1994), as quais induzem a expressão de RGs no hipocampo (MITCHELL *et al.*, 1990, YAU *et al.*, 1997a). A 5-HT age por meio do receptor 5-HT<sub>7</sub>, o qual é regulado por Gs (YAU *et al.*, 1997b) e positivamente ligado à adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (MEANEY *et al.*, 2000). Fatores de transcrição associados ao AMPc, tais como a proteína indutora de fator de crescimento de nervo (NGFI-A) são então estimulados (ENCIO & DETERA-WALDLEIGH, 1991). Embora o NGFI-A tenha uma baixa afinidade por seu sítio de reconhecimento na seqüência de ADN responsável pela produção de RG, estimulação tátil provoca um grande aumento nos níveis desse fator de transcrição, aumentando então as chances de ligação (ENCIO & DETERA-WALDLEIGH, 1991). A ligação do NGFI-A resulta no recrutamento de histona acetiltransferases, as quais aumentam a acetilação das histonas, facilitando acesso para desmetilases e desmetilação da região promotora para RG (CARVIN *et al.*, 2003). A região promotora desmetilada tem uma alta afinidade por NGFI-A, resultando em maior atividade do promotor para RG induzida pro NGFI-A no

hipocampo, aumentando a produção de RGs nessa estrutura, fazendo com que o mecanismo de retroalimentação negativa seja mais eficiente (SILVEIRA *et al.*, 2007). Uma análise temporal da metilação do promotor do RG indica que as diferenças entre MC e PC emergem durante o período pós-parto e são sustentadas no desmame e até a vida adulta (CHAMPAGNE & CURLEY, 2009).

## *2. Objetivos*

---

## **2.1 Geral**

Este trabalho teve o intuito de analisar o efeito das variações de cuidado materno sobre parâmetros hormonais (níveis de CORT e OT plasmáticas) e neuroquímicos (atividade da serotonina, dopamina e noradrenalina centrais) envolvidos nas respostas ao estresse na prole – machos e fêmeas – no período neonatal. Esses parâmetros foram avaliados em situação basal e após o estresse.

## **2.2 Específicos**

- 2.2.1 Analisar o comportamento materno de ratas “Pouco-cuidadoras” e “Muito-cuidadoras”;
- 2.2.2 Analisar os níveis de CORT entre as proles de genitoras “Pouco-cuidadoras” e “Muito-cuidadoras”. Foram investigados os níveis hormonais em uma situação basal em filhotes controles e em uma situação de estresse (filhotes sacrificados 15 e 30 minutos após o estressor);
- 2.2.3 Analisar o nível de OT entre as proles de genitoras “Pouco-cuidadoras” e “Muito-cuidadoras”. Foram investigados os níveis hormonais em uma situação basal em filhotes controles e em uma situação de estresse (filhotes sacrificados 15 e 30 minutos após o estressor);
- 2.2.4 Analisar a atividade da serotonina, dopamina, noradrenalina, os metabólitos de serotonina e dopamina (5HIAA e DOPAC, respectivamente) e a razão de serotonina e dopamina e (5HIAA/5-HT e DOPAC/DA, respectivamente) em estruturas encefálicas envolvidas no estresse, tais como hipotálamo e

hipocampo entre as proles de genitoras “Pouco-cuidadoras” e “Muito-cuidadoras”. Foi investigada a atividade desses neurotransmissores em uma situação basal em filhotes controles e em uma situação de estresse (filhotes sacrificados 15 após o estressor);

- 2.2.5 Analisar se há diferenças de gênero nos filhotes nestes parâmetros basais e em situação de estresse.

### *3. Métodos*

---

### **3.1 Tipo de Estudo**

Análise quantitativa com coleta de dados (bioquímicos, como níveis plasmáticos de CORT e OT e níveis centrais de neurotransmissores e seus metabólitos no hipotálamo e hipocampo). São dados contínuos e discretos e foram analisados através de testes estatísticos paramétricos (conforme descrito na metodologia) (ver ZAR, 1996).

### **3.2 Local**

Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **3.3 Coleta de dados**

Através de protocolos de análises comportamentais e bioquímicas, tais como registro de comportamento materno, radioimunoensaio e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (HPLC-ED).

### **3.4 Análise estatística**

Os dados paramétricos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e média  $\pm$  desvio padrão da média – neste último caso, somente para avaliação do comportamento de lambida. As comparações dos grupos quanto ao cuidado materno (frequência de lambidas) foi realizada por meio do Teste *t* de *Student*. As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de três vias, sendo que as variáveis independentes foram: cuidado materno, gênero e estresse (ZAR, 1996).



### **3.5 Aspectos Éticos**

Todos os procedimentos obedeceram às normas propostas pelos Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences – CIOMS; GOLDIM & RAYMUNDO, 1997*).

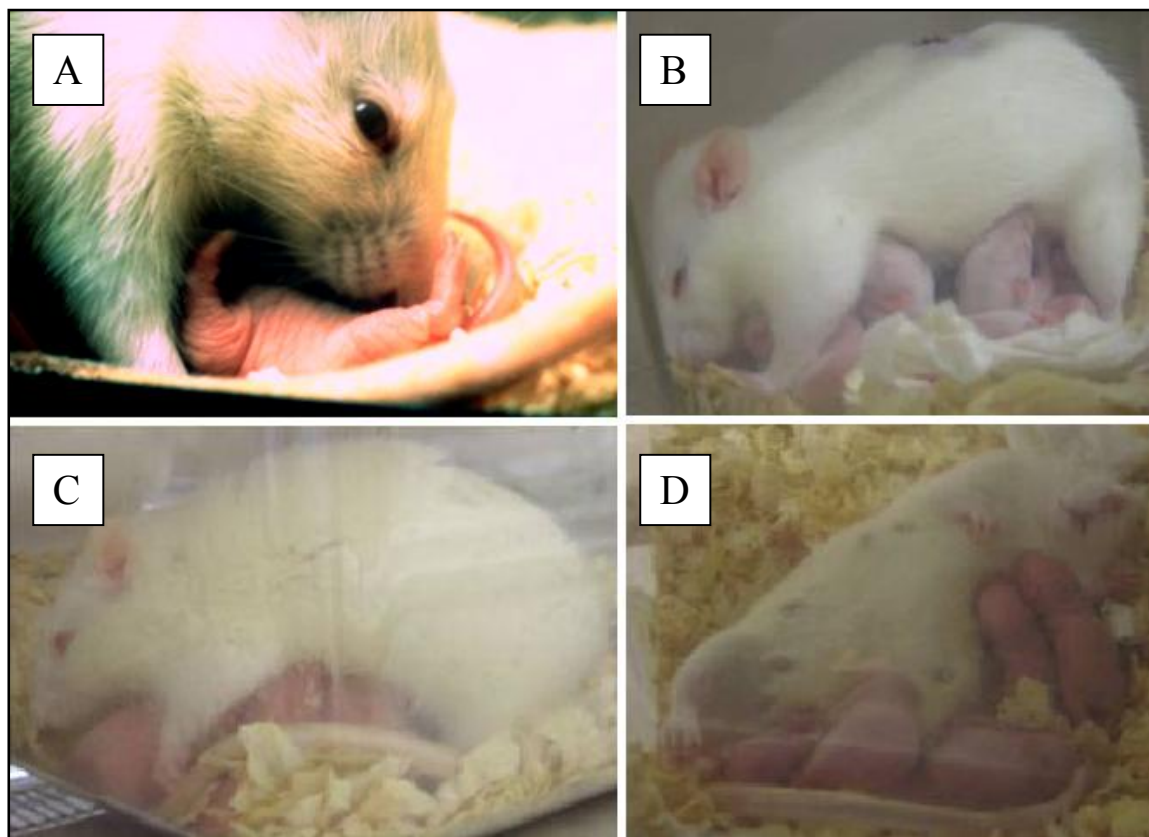
Este trabalho apresentou parecer favorável da Comissão de Pós-Graduação do PPG em Neurociências.

### **3.6 Animais**

Foram utilizadas 61 ratas Wistar prenhes provenientes do Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. As ratas foram levadas ao biotério particular do Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento cerca de uma semana antes do parto, onde os animais foram tratados pelos próprios funcionários do CREAL. Os animais foram colocados individualmente em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm) cujo piso era forrado com maravalha (lascas de madeira autoclavadas), com água e ração *ad libitum* (*Rodent Chow*, Nutrilab), em um ciclo claro/escuro 12/12h – sendo que as luzes eram desligadas às 18h, temperatura ambiente de  $22 \pm 1$  °C e observadas diariamente para determinar a data do nascimento dos filhotes. No final do dia do parto, definido como dia pós-parto “zero” (P0), as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes cada uma. Foram utilizados 6 filhotes – 3 machos e 3 fêmeas – de cada ninhada das ratas lactantes selecionadas.

### **3.7 Avaliação do cuidado materno**

A partir do dia 1 pós-parto (P1), as ratas lactantes foram avaliadas quanto ao cuidado materno em relação à sua prole nos primeiros 10 dias pós-parto. O comportamento materno era avaliado por meio de planilhas de registro (Anexo), no qual o experimentador anota de forma pontual – a cada 3 minutos, o comportamento observado de cada rata lactante. Foram realizadas 4 sessões de registros por dia, 75 min cada, nos seguintes horários: 9:30, 12:30, 15:30 e 18:30 h (URIARTE *et al*, 2007). Os registros de comportamento materno não são filmados. O cuidado materno foi avaliado pela quantidade de lambidas da mãe nos filhotes (Figura 2A) e de outros comportamentos maternos, tais como: amamentação com dorso bem arqueado (Figura 2B), amamentação com dorso bem arqueado juntamente com o comportamento de lambida, amamentação com dorso pouco arqueado (Figura 2C), amamentação em supino (Figura 2D), construção de ninho, recolhida de filhote, filhote fora do ninho, mãe no ninho sem exibir outros comportamentos maternos, mãe fora do ninho (MEANEY, 2001, URIARTE *et al*, 2007). Alguns desses comportamentos estão ilustrados a seguir (Figura 2). O comportamento das ratas lactantes foi registrado durante os primeiros 10 dias e foram somados para que as análises dos dados fossem realizadas.



**Figura 2:** **A)** Comportamento de lambida; **B)** Amamentação em dorso muito arqueado; **C)** Amamentação em dorso pouco arqueado; **D)** Amamentação em supino.

Segundo o método utilizado pelo grupo de pesquisa de Michael J. Meaney, foram selecionadas as ratas que apresentaram menor cuidado materno e as que apresentaram maior cuidado materno, definidas como “Pouco-Cuidadoras” e “Muito-Cuidadoras”, respectivamente. De acordo com este método, o comportamento materno levado em conta para determinar os grupos experimentais é o comportamento de lambidas da rata lactante em sua prole. A partir da média da frequência do comportamento de lambida da população, é somado ou diminuído o desvio padrão para obter o grupo das ratas Muito-Cuidadoras e

Pouco-Cuidadoras, respectivamente (CALDJI *et al*, 1998; FRANCIS *et al*, 1999a; LIU *et al*, 1997).

### **3.8 Procedimentos experimentais com os animais**

Quando os filhotes estavam no P13, foi realizado o procedimento de estresse por frio, o qual foi adaptado da literatura (AGUIAR *et al*, 1997; CUI *et al*, 2004; PADOIN *et al*, 2001; YI & BARAM, 1994). O procedimento de estresse neonatal consistia em colocar 4 filhotes da mesma ninhada – 2 machos e 2 fêmeas – dentro de um recipiente de plástico e expô-los a uma câmara fria (0°C) por 6 minutos. Passado o tempo do estresse, o recipiente plástico contendo os animais era retirado da câmara e colocado em um local à temperatura ambiente. Após 15 minutos do estresse, foram sacrificados por decapitação 1 macho e 1 fêmea, e mais 15 minutos após, foram sacrificados mais 1 macho e 1 fêmea. O sangue foi coletado do tronco e os encéfalos foram rapidamente removidos e dissecados o hipotálamo e o hipocampo de acordo com GAMARO *et al.*, 2003. Os animais controles – 1 macho e 1 fêmea – foram sacrificados imediatamente após a retirada da companhia de suas genitoras e coletadas as amostras descritas anteriormente.

Uma vez que as estruturas foram dissecadas e guardadas separadamente em *ependorfs* e o sangue foi centrifugado a 10.000 RPM a 4°C por 10 minutos e coletado o plasma, as amostras foram mantidas no freezer a -70°C e guardadas para posteriores análises bioquímicas.

A decapitação foi realizada para a coleta de sangue e estruturas encefálicas dos filhotes. Os animais foram gentilmente manuseados e conduzidos do biotério do laboratório até a sala adjacente onde foram realizados os procedimentos experimentais e o sacrifício. O

procedimento da decapitação foi realizado de forma rápida com uma tesoura afiada, sob condições ideais de temperatura e ruído de forma a evitar qualquer sofrimento dos animais.

### **3.9 Grupos Experimentais**

Os grupos experimentais foram os seguintes:

- a) filhotes machos controle de mães Pouco-cuidadoras (CORT, n=9, OT, n=9, 5-HIAA/5-HT hipotálamo, n=6, DOPAC/DA hipotálamo, n=6, NA hipotálamo, n=7, 5-HIAA/5-HT hipocampo, n=6, NA hipocampo, n=6);
- b) filhotes fêmeas controle de mães Pouco-cuidadoras (CORT, n=7, OT, n=4, 5-HIAA/5-HT hipotálamo, n=7, DOPAC/DA hipotálamo, n=6, NA hipotálamo, n=6, 5-HIAA/5-HT hipocampo, n=7, NA hipocampo, n=7);
- c) filhotes machos de mães Pouco-cuidadoras submetidos ao estresse e sacrificados 15 minutos após o estresse (CORT, n=9, OT, n=6, 5-HIAA/5-HT hipotálamo, n=7, DOPAC/DA hipotálamo, n=7, NA hipotálamo, n=7, 5-HIAA/5-HT hipocampo, n=7, NA hipocampo, n=7);
- d) filhotes fêmeas de mães Pouco-cuidadoras submetidos ao estresse e sacrificados 15 minutos após o estresse (CORT, n=9, OT, n=8, 5-HIAA/5-HT hipotálamo, n=7, DOPAC/DA hipotálamo, n=7, NA hipotálamo, n=7, 5-HIAA/5-HT hipocampo, n=7, NA hipocampo, n=7);
- e) filhotes machos de mães Pouco-cuidadoras submetidos ao estresse e sacrificados 30 minutos após o estresse (CORT, n=9, OT, n=9);
- f) filhotes fêmeas de mães Pouco-cuidadoras submetidos ao estresse e sacrificados 30 minutos após o estresse (CORT, n= 8, OT, n=4);

- g) filhotes machos controle de mães Muito-cuidadoras (CORT, n=5, OT, n=6, 5-HIAA/5-HT hipotálamo, n=6, DOPAC/DA hipotálamo, n=4, NA hipotálamo, n=5, 5-HIAA/5-HT hipocampo, n=5, NA hipocampo, n=5);
- h) filhotes fêmeas controle de mães Muito-cuidadoras (CORT, n=5, OT, n=4, 5-HIAA/5-HT hipotálamo, n=5, DOPAC/DA hipotálamo, n=5, NA hipotálamo, n=6, 5-HIAA/5-HT hipocampo, n=6, NA hipocampo, n=6);
- i) filhotes machos de mães Muito-cuidadoras submetidos ao estresse e sacrificados 15 minutos após o estresse (CORT, n=8, OT, n=7, 5-HIAA/5-HT hipotálamo, n=6, DOPAC/DA hipotálamo, n=4, NA hipotálamo, n=6, 5-HIAA/5-HT hipocampo, n=6, NA hipocampo, n=6);
- j) filhotes fêmeas de mães Muito-cuidadoras submetidos ao estresse e sacrificados 15 minutos após o estresse (CORT, n=8, OT, n=5, 5-HIAA/5-HT hipotálamo, n=6, DOPAC/DA hipotálamo, n=5, NA hipotálamo, n=6, 5-HIAA/5-HT hipocampo, n=6, NA hipocampo, n=6);
- k) filhotes machos de mães Muito-cuidadoras submetidos ao estresse e sacrificados 30 minutos após o estresse (CORT, n= 8, OT, n=7);
- l) filhotes fêmeas de mães Muito-cuidadoras submetidos ao estresse e sacrificados 30 minutos após o estresse (CORT, n=6, OT, n=4);

Para as dosagens de OT e CORT plasmática foram usados todos os grupos. No entanto, para as dosagens das monoaminas foram utilizados somente os grupos os quais foram sacrificados 15 minutos após o estressor devido à restrição de quantidade de amostras possíveis de serem dosadas pelo método empregado. Este tempo após o estresse foi escolhido pois trabalhos com estresse agudo observaram mudanças na atividade

encefálica – tais como em estruturas envolvidas no estresse e em neurônios monoaminérgicos – 15 min após o estressor (DUNN, 1988c; DENT *et al.*, 2000; DENT *et al.*, 2001).

### **3.10 Análises Bioquímicas**

As análises bioquímicas foram realizadas em Ribeirão Preto, SP, na Universidade de São Paulo – USP. As análises de CORT e OT plasmáticas foram realizadas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Fisiologia. As análises das monoaminas centrais foram realizadas no Laboratório de Neuroendocrinologia localizado na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

#### **3.10.1 Dosagem de Corticosterona Plasmática por Radioimunoensaio**

A CORT plasmática dos filhotes foi dosada pelo método de radioimunoensaio, no qual foi realizada após a extração prévia das amostras de plasma com etanol. No radioimunoensaio foram utilizados padrão e anticorpo específico adquiridos da Sigma Co. (USA) e hormônio triciado adquirido da Amershan (USA). A separação das frações livre e ligada foi realizada com carvão-dextran (0,5 / 0,05%). A dose mínima detectável foi 0,08 ng/ml, o erro intra-ensaio de 4,5 % e o erro inter-ensaio de 11%.

#### **3.10.2 Dosagem de Ocitocina Plasmática por Radioimunoensaio**

A dosagem de OT foi realizada por radioimunoensaio de duplo anticorpo. Alíquotas de 250 µl de plasma foram pipetadas em tubos aos quais foram adicionados 500 µl de acetona à 4°C. Após agitação por 1 minuto e centrifugação (3.000 RPM) os conteúdos

sobrenadantes foram vertidos em outros tubos com a adição de 1 ml de éter de petróleo à 4°C. Após agitação de 1 minuto, a fase superior foi aspirada e a fase inferior foi liofilizada e armazenada a -20°C. Para o radioimunoensaio, material liofilizado foi descongelado e ressuspenso em solução tamponada num volume correspondente a 40 % do volume de plasma utilizado, ou seja, 100 µl. O anticorpo específico para OT produzido em coelho e hormônio iodinado foram gentilmente cedidos pela Dra. Mariana Morris (Wright State University, USA) e pelo Prof. Dr. José Antunes Rodrigues, respectivamente. A anti-gamaglobulina para precipitação da reação do radioimunoensaio foi produzida em ovelha pelo Dr. Celso Rodrigues Franci (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Brasil, SP). O padrão utilizado como referência (OT – 8152) foi adquirido da Bachem- Peninsula Laboratories (Califórnia,USA). As amostras de um mesmo experimento foram dosadas no mesmo ensaio. O erro intra-ensaio foi de 6% e a dose mínima detectável 0,8 pg/ml.

### **3.10.3 Dosagem de Monoaminas por Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detecção Eletroquímica (HPLC-ED)**

A dosagem de serotonina, dopamina e noradrenalina, e dos metabólitos de serotonina e dopamina nas estruturas encefálicas dos filhotes foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (HPLC-ED), segundo a metodologia descrita abaixo. A figura 3 apresenta uma representação esquemática do aparato.

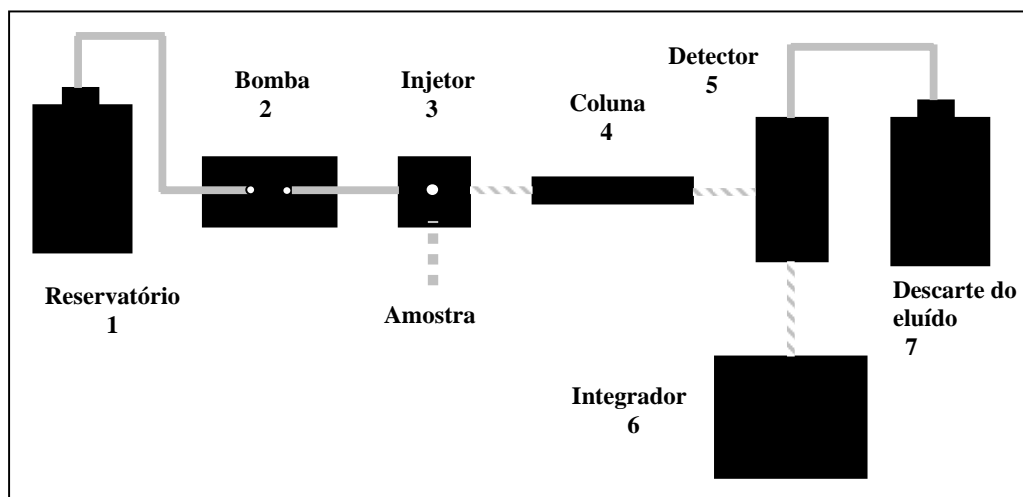
Amostras de hipotálamo e hipocampo (direito e esquerdo juntos) foram homogeneizadas em 1000 e 400 µl, respectivamente, de uma solução de ácido perclórico 0.2 M e EDTA 0.1 mM, contendo 450 nM de 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA; Aldrich,



Milwaukee, E.U.A.) como padrão interno. Os homogenatos foram centrifugados por 20 min a 12.500 g e o sobrenadante foi filtrado em um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millex, PVDF, Millipore, Belford, MA, EUA). No *pellet* restante, o conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Amostras foram injetadas por um injetor automático (SIL-10Advp; Shimadzu, Kioto, Japão) para análise no HPLC-ED. A separação foi executada a 35 °C por uma coluna de fase reversa C18 de 250 x 4 mm (Purospher Star, 5  $\mu\text{m}$ ; Merck, Darmstadt, Alemanha), precedida por uma pré-coluna C18 de 4 x 4 mm (Lichrospher, 5  $\mu\text{m}$ , Merck). A fase móvel foi bombeada por uma bomba de duplo pistão (LC-10Advp; Shimadzu), sendo constituída de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, NaCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, ácido octanesulfônico de sódio 0,19 mM, metanol 13,5%, pH 3,5, ajustado com  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . O fluxo da bomba foi de 0,5 mL/min. O potencial do detector eletroquímico foi fixado em 0,60 V vs. eletrodo de referência, *in situ* Ag/AgCl (Decade, VT-03 electrochemical flow cell; Antec Leyden, Holanda). Os dados da cromatografia foram analisados usando o programa Classe-VP *software* (Shimadzu). Os picos referentes a 5-HT, 5-HIAA, DA, DOPAC e NA foram identificados pelos seus tempos de retenção no cromatograma. A quantificação foi realizada de acordo com a área do pico por curva de calibração no método do padrão interno (DHBA). As amostras foram analisadas em um mesmo ensaio. O coeficiente de variação intraensaio foi menor que 5% para todos os compostos analisados.

A renovação (ou “*turnover*”, que é a relação de síntese e degradação de neurotransmissor, dado pela razão metabólito/neurotransmissor) é tida como parâmetro da atividade do sistema de neurotransmissor (BALDESSARINI, 1972; KORF *et al.*, 1973; DUNN & BERRIDGE, 1987; DALLA *et al.*, 2008). Esse parâmetro reflete a síntese e a utilização do neurotransmissor, ou seja, o seu metabolismo. Por exemplo, níveis

aumentados de um metabólito refletem maiores níveis do neurotransmissor liberado disponível para metabolização, enquanto maiores níveis do neurotransmissor no tecido podem refletir síntese aumentada (SULLIVAN & DUFRESNE, 2006). Neste trabalho, foi analisado a renovação da 5-HT e da DA. Não foi possível avaliar a renovação da NA, uma vez que a fase móvel usada no HPLC-ED não permite dosar o metabólito desta CA (DHPG). Não foi possível fazer a dosagem de DA e DOPAC no hipocampo. A atividade dopaminérgica hipocampal é conhecida por ser baixa comparada às outras estruturas encefálicas (BISCHOFF *et al.*, 1979; VERNEY *et al.*, 1985; YOKOYAMA *et al.*, 1994). No trabalho de PAPAIOANNOU *et al.*, 2002, com ratos de 1 e 3 meses de idade também não foi possível avaliar a renovação de DA no hipocampo pois os níveis de DOPAC foram tão baixos que em muitas amostras eles ficaram abaixo do limite de detecção do método (HPLC).



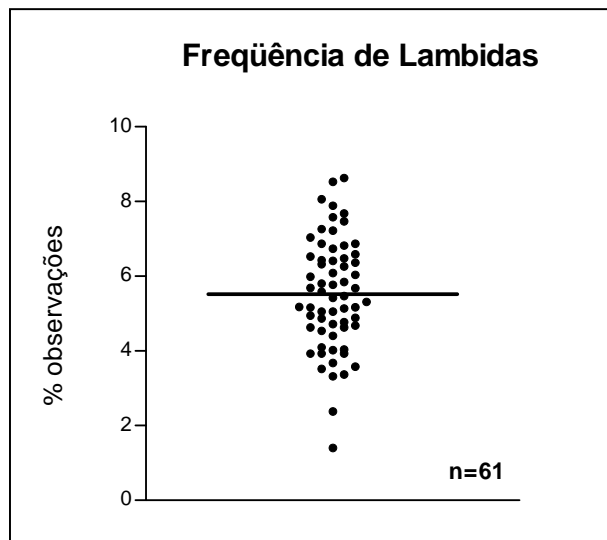
**Figura 3:** Esquema funcional do HPLC: 1 – Reservatório de solvente (fase móvel), 2 – Bomba de alta pressão ou alta performance, 3 – Injetor, injetor da amostra, 4 – Coluna de separação C18 (fase estacionária), 5 – Detector (Eletroquímico), 6 – Integrador (Computador – dados analisados), 7 – Reservatório,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

## ***4. Resultados***

---

## 4.1 Comportamento Materno

4.1.1 Distribuição da freqüência do comportamento de lambidas da população de genitoras (Figura 4). Média geral da população foi  $5,52 \pm 0,1863$  (média  $\pm$  desvio padrão).

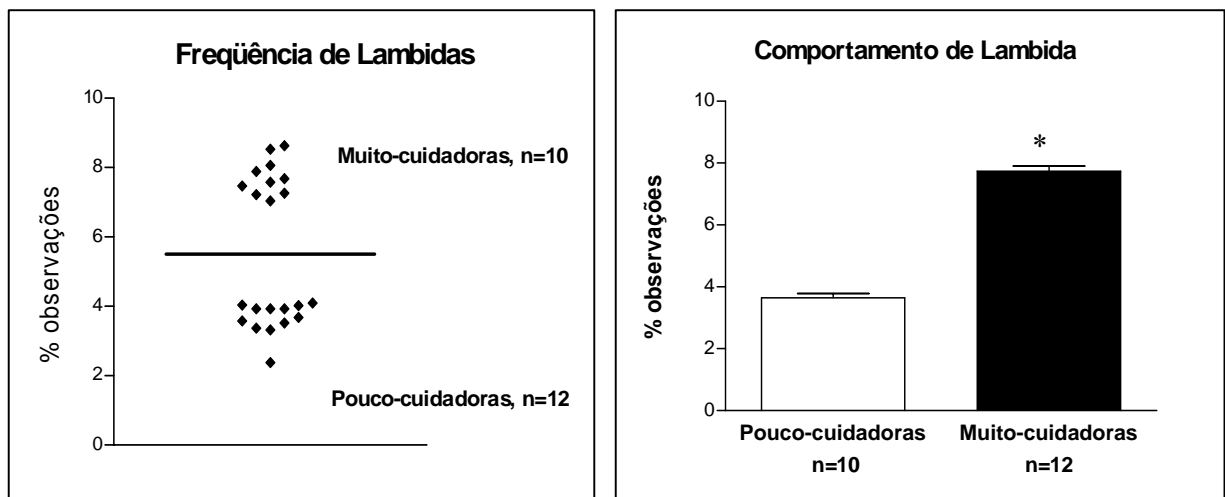


**Figura 4.** Porcentagem da freqüência de lambidas da população das genitoras para posterior divisão dos grupos durante os 10 dias de observação.

4.1.2 Classificação dos grupos com base na média e desvio padrão do comportamento de lambidas da população (CALDJI *et al*, 1998; FRANCIS *et al*, 1999a; LIU *et al*, 1997):

Foram selecionadas como grupo Muito-cuidadoras as genitoras com valores de comportamento de lambida acima de 6,991 ( $n= 10$ , média+desvio padrão), e como grupo Pouco-cuidadoras aquelas apresentando os valores abaixo de 4,1814 ( $n=12$ , média-desvio padrão). Na Figura 5A mostra-se distribuição do comportamento de lamber nos grupos Muito-cuidadoras e Pouco-cuidadoras, na Figura 5B a média  $\pm$  desvio padrão do

comportamento de lamber dos grupos Muito-cuidadoras ( $7,736 \pm 0,1711$ ) e Pouco-cuidadoras ( $3,650 \pm 0,1390$ ). A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa ( $P < 0,0001$ , Teste-t de *Student*).



**Figura 5.** A. Divisão dos grupos em Muito e Pouco-cuidadoras com base na frequência de lambidas. B. Frequência de lambidas estatisticamente diferente segundo análise por Teste-t *Student* (\*\*\*:  $P < 0,0001$   $n=10-12$  animais/grupo).

#### 4.1.3 Outros comportamentos maternos das lactantes Pouco e Muito-Cuidadoras

Foram realizadas análises estatísticas (Teste-t de *Student*) de forma a buscar correlações do comportamento de lambida das ratas lactantes Pouco-Cuidadoras e Muito-Cuidadoras com os demais comportamentos maternos observados. Os resultados estão expressos na Tabela 1 a seguir, apresentando as médias, erros padrões e o valor de P.

Comportamento	Pouco-Cuidadoras	Muito-cuidadoras	P
	Média ± erro padrão		
Amamentação em dorso bem arqueado	36,95 ± 3,71	42,70 ± 3,91	=0,30
Amamentação em dorso bem arqueado + lambida	2,54 ± 0,17	6,09 ± 0,16	<0,0001*
Amamentação em dorso pouco arqueado	4,31 ± 1,10	2,31 ± 0,83	=0,12
Amamentação em supino	1,98 ± 0,64	3,64 ± 0,93	=0,15
Total de amamentação	43,25 ± 3,74	48,65 ± 4,05	=0,33
Lactante fora do ninho	51,60 ± 3,82	41,11 ± 3,20	=0,0536*
Filhote fora do ninho	2,67 ± 0,67	0,38 ± 0,20	<0,007*
Recolhida de filhote	0,15 ± 0,05	0,09 ± 0,03	=0,40
Construção de ninho	1,36 ± 0,56	1,11 ± 0,27	=0,71

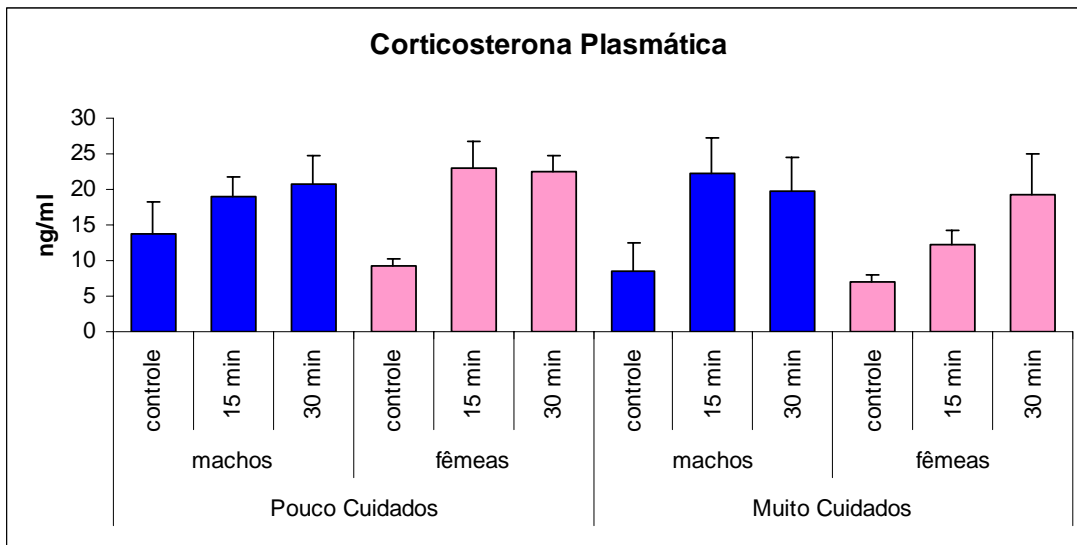
Tabela 1

## 4.2 Corticosterona e Ocitocina Plasmáticas nos Filhotes

### 4.2.1 Corticosterona Plasmática dos Filhotes

Abaixo está representado o gráfico que mostra os níveis de CORT plasmática dos filhotes. As variáveis utilizadas foram: cuidado materno, gênero e estresse.

A ANOVA de três vias com post hoc de Duncan mostrou um efeito do estresse aumentando os níveis de CORT (não houve diferença quanto ao tempo após a exposição ao estresse por frio) [ $F(1,79) = 8,416$ ;  $P < 0,05$ ]. Não houve efeito do cuidado materno [ $F(1,79) = 1,994$ ;  $P > 0,05$ ] e do gênero [ $F(1,79) = 0,597$ ;  $P > 0,05$ ], conforme o gráfico da Figura 6.

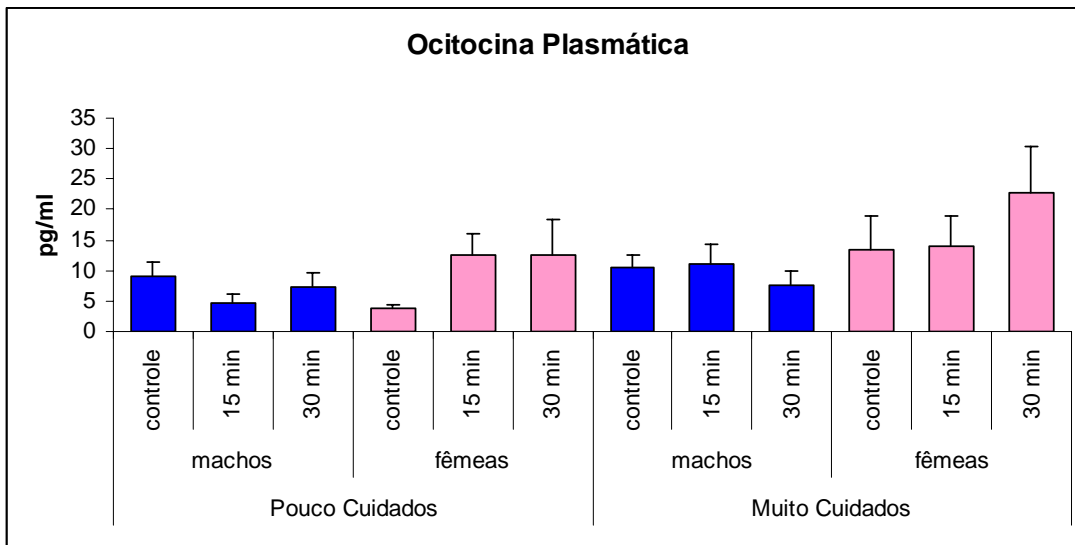


**Figura 6.** Análise dos níveis de CORT plasmática nos filhotes de genitoras Muito e Pouco-cuidadoras. ANOVA de três vias mostrou efeitos do estresse aumentando os níveis da CORT ( $P < 0,05$ ,  $N = 5-9$  animais/grupo).

#### 4.2.2 Ocitocina Plasmática dos Filhotes

Abaixo está representado o gráfico que mostra os níveis de OT plasmática dos filhotes. As variáveis utilizadas foram: cuidado materno, gênero e estresse.

A ANOVA de três vias mostrou efeito do cuidado materno [ $F(1,61) = 5,961371$ ;  $P < 0,05$ ] e do gênero [ $F(1,61) = 5,857674$ ;  $P < 0,05$ ]. O post hoc de Duncan mostrou que os filhotes fêmeas de mães Muito-Cuidadoras são diferentes dos demais grupos, conforme o gráfico da Figura 7. Não houve efeito do estresse [ $F(1,61) = 0,906$ ;  $P > 0,05$ ].



**Figura 7.** Níveis plasmáticos de OT, mostrando efeito do cuidado materno e do gênero (ANOVA de três vias,  $P < 0,05$   $N = 4-9$  animais/grupo).

#### 4.3 Atividade da Serotonina, Dopamina e níveis de Noradrenalina no Hipotálamo

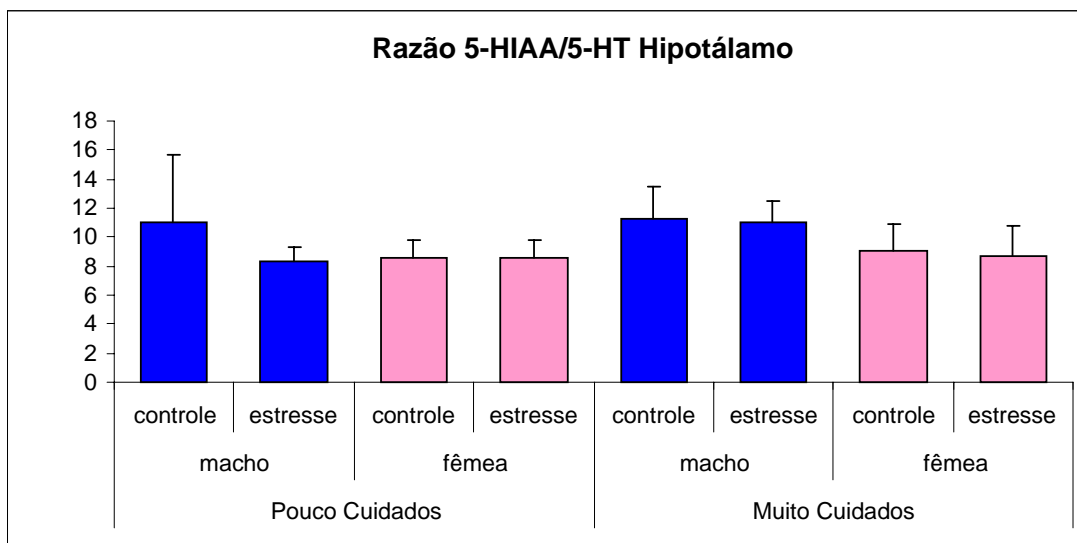
##### 4.3.1 Atividade da Serotonina no Hipotálamo

Quanto aos níveis da 5-HT no hipotálamo dos filhotes, a ANOVA de três vias não mostrou diferença significativa entre os grupos: gênero [ $F(1,42) = 0,126424$ ;  $P > 0,05$ ], cuidado materno [ $F(1,42) = 0,628468$ ;  $P > 0,05$ ] e estresse [ $F(1,42) = 0,011526$ ;  $P > 0,05$ ].

Quanto aos níveis de 5-HIAA no hipotálamo dos filhotes, a ANOVA de três vias não mostrou diferença significativa entre os grupos: gênero [ $F(1,42) = 2,758633$ ;  $P > 0,05$ ], cuidado materno [ $F(1,42) = 0,002145$ ;  $P > 0,05$ ] e estresse [ $F(1,42) = 0,276703$ ;  $P > 0,05$ ].

Na figura 8 estão apresentados os níveis da razão de 5-HIAA/5-HT no hipotálamo dos filhotes. A ANOVA de três vias não mostrou diferença significativa entre os grupos: gênero [ $F(1,42) = 1,209067$ ;  $P > 0,05$ ], cuidado materno [ $F(1,42) = 0,314323$ ;  $P > 0,05$ ] e estresse [ $F(1,42) = 0,302244$ ;  $P > 0,05$ ].





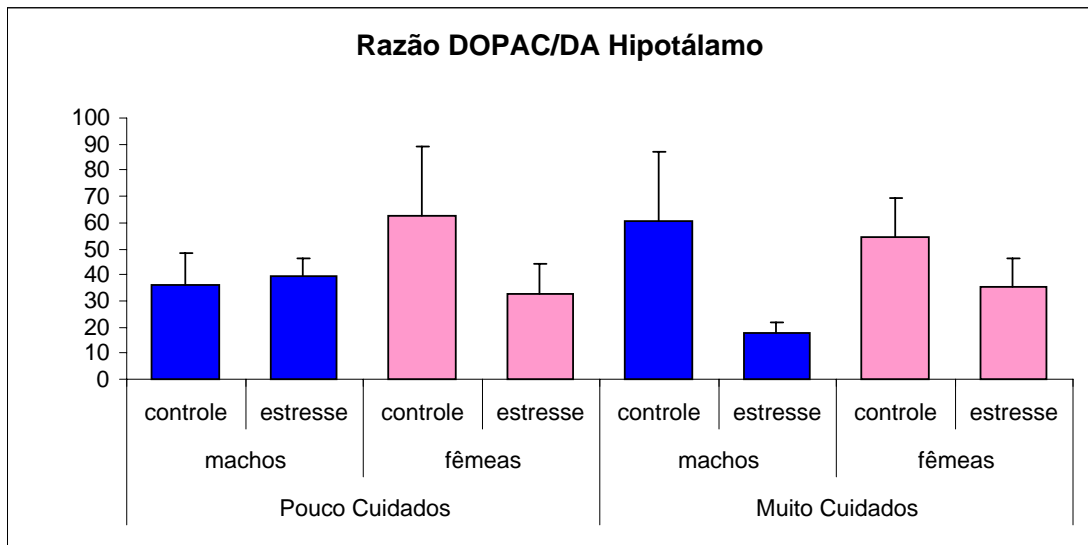
**Figura 8.** Níveis da razão de 5-HIAA/5-HT no hipotálamo dos filhotes. Não houve diferença significativa entre os grupos: gênero, cuidado materno e estresse ( $P > 0,05$ ,  $N = 5-7$  animais/grupo).

#### 4.3.2 Atividade da Dopamina no Hipotálamo

Quanto aos níveis de DA no hipotálamo dos filhotes, a ANOVA de três vias não mostrou diferença significativa entre os grupos: gênero [ $F(1,42) = 0,089926$ ;  $P > 0,05$ ], cuidado materno [ $F(1,42) = 0,826636$ ;  $P > 0,05$ ] e estresse [ $F(1,42) = 0,521025$ ;  $P > 0,05$ ].

Quanto aos níveis de DOPAC no hipotálamo dos filhotes, a ANOVA de três vias não mostrou diferença significativa entre os grupos: gênero [ $F(1,42) = 1,15492$ ;  $P > 0,05$ ], cuidado materno [ $F(1,42) = 1,00923$ ;  $P > 0,05$ ] e estresse [ $F(1,42) = 0,405969$ ;  $P > 0,05$ ].

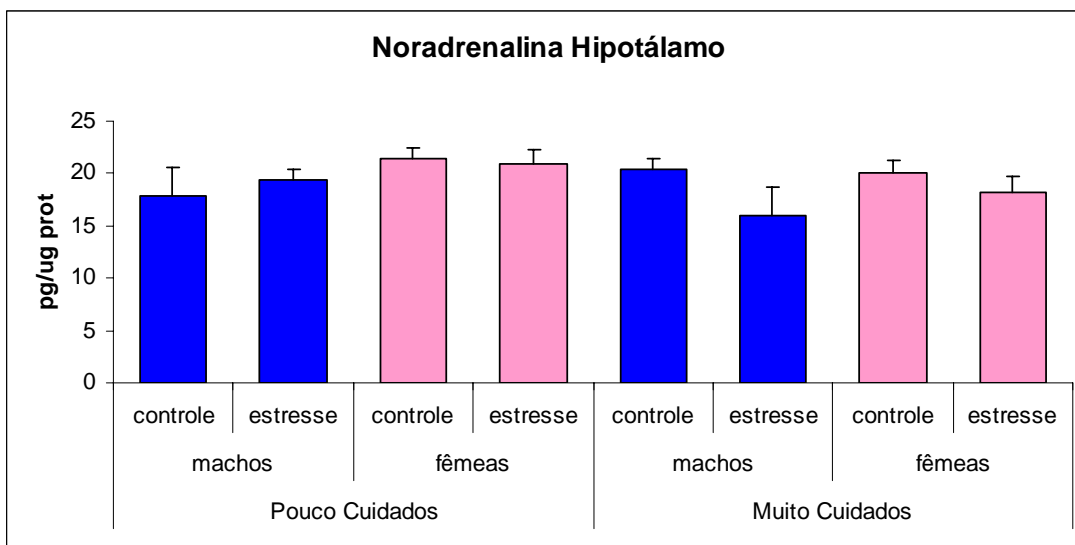
Na figura 9 os níveis da razão DOPAC/DA no hipotálamo dos filhotes estão representados. A ANOVA de três vias mostrou um efeito do estresse [ $F(1,36) = 3,892364$ ;  $P = 0,05$ ]. Não houve efeito do cuidado materno [ $F(1,36) = 0,00188$ ;  $P > 0,05$ ] e do gênero [ $F(1,36) = 0,472025$ ;  $P > 0,05$ ].



**Figura 9.** Níveis da razão DOPAC/DA no Hipotálamo dos filhotes mostrando um efeito do estresse (ANOVA de três vias,  $P=0,05$ ,  $N= 4-7$  animais/grupo).

#### 4.3.3 Níveis de Noradrenalina no Hipotálamo

Na figura 10 estão apresentados os níveis de NA no hipotálamo dos filhotes. A ANOVA de três vias não mostrou diferença significativa entre os grupos: gênero [ $F(1,42) = 1,960965$ ;  $P>0,05$ ], cuidado materno [ $F(1,42) = 0,931597$ ;  $P>0,05$ ] e estresse [ $F(1,42) = 1,115024$ ;  $P>0,05$ ].



**Figura 10.** Níveis de NA no hipotálamo dos filhotes. Não houve diferença significativa entre os grupos: gênero, cuidado materno e estresse ( $P > 0,05$ ,  $N = 5-7$  animais/grupo).

#### 4.4. Atividade da Serotonina e Níveis de Noradrenalina no Hipocampo

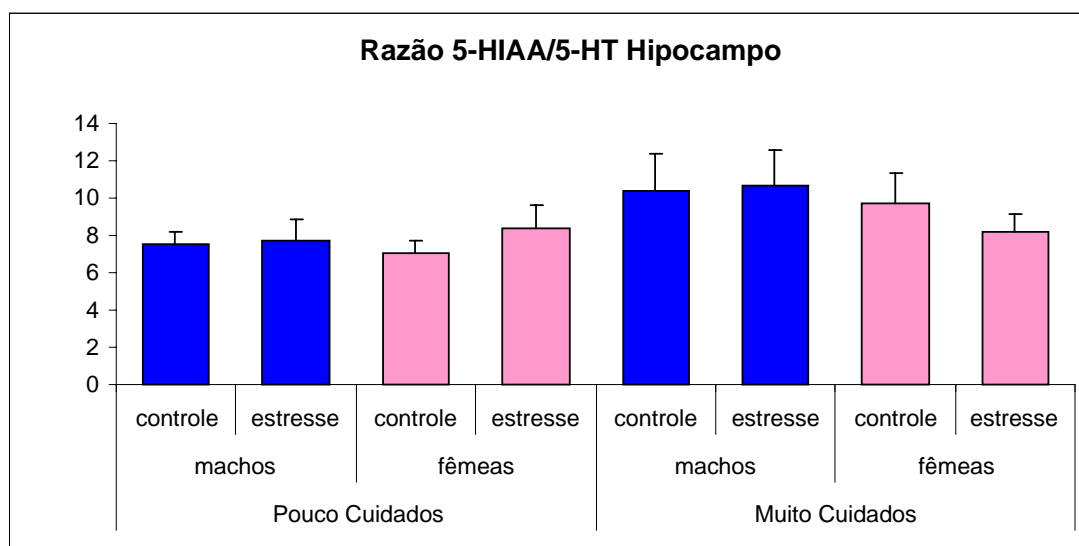
##### 4.4.1 Atividade da Serotonina no Hipocampo

Quanto aos níveis do neurotransmissor 5-HT no hipocampo dos filhotes, a ANOVA de três vias mostrou uma tendência ao efeito do cuidado materno, na qual os níveis de serotonina se mostram aumentados nos filhotes de mães Pouco-cuidadoras em relação aos filhotes de mães Muito-cuidadoras [ $F(1,42) = 3,621149$ ;  $P = 0,063919$ ]. Não houve efeito do gênero [ $F(1,42) = 0,058438$ ;  $P > 0,05$ ] e do estresse [ $F(1,42) = 0,117243$ ;  $P > 0,05$ ].

Quanto aos níveis de 5HIAA no hipocampo dos filhotes, a ANOVA de três vias não mostrou diferença significativa entre os grupos: gênero [ $F(1,42) = 0,375375$ ;  $P > 0,05$ ], cuidado materno [ $F(1,42) = 0,25006$ ;  $P > 0,05$ ] e estresse [ $F(1,42) = 0,032777$ ;  $P > 0,05$ ].

Na figura 11 está representado o gráfico que mostra os níveis da razão 5-HIAA/5-HT no Hipocampo dos filhotes. A ANOVA de três vias mostrou efeito do cuidado materno, demonstrando que filhotes de mães Muito-cuidadoras apresentam níveis aumentados da

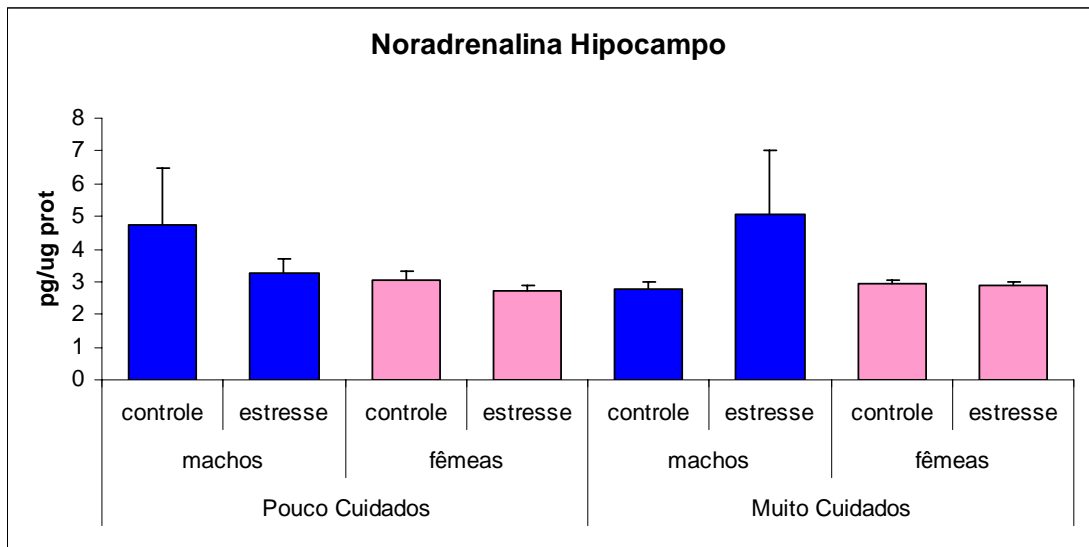
razão 5HIAA/5-HT no hipocampo em relação aos filhotes de mães Pouco-cuidadoras [F(1,42) = 4,991547; P<0,05]. Não houve efeito do gênero [F(1,42) = 0,63287; P>0,05] e do estresse [F(1,42) = 0,006819; P>0,05].



**Figura 11.** Níveis da razão 5-HIAA/5-HT no Hipocampo dos filhotes mostrando um efeito do cuidado materno (ANOVA de três vias). Os filhotes de mães Muito-cuidadoras apresentam níveis da razão 5-HIAA/5-HT no hipocampo aumentados em relação aos filhotes de mães Pouco-cuidadoras (P<0,05). N= 5-7 animais/grupo.

#### 4.4.2 Níveis de Noradrenalina no Hipocampo

Na figura 12 estão apresentados os níveis de noradrenalina no hipocampo dos filhotes. A ANOVA de três vias não mostrou diferença significativa entre os grupos: gênero [F(1,42) = 2,646853; P>0,05], cuidado materno [F(1,42) = 0,000876; P>0,05] e estresse [F(1,42) = 0,028411; P>0,05].



**Figura 12.** Níveis de Noradrenalina no hipocampo dos filhotes. Não houve diferença significativa entre os grupos: gênero, cuidado materno e estresse ( $P > 0,05$ ,  $N = 5-7$  animais/grupo).

## *5. Discussão*

---

O cuidado materno no período neonatal influencia a regulação das respostas ao estresse, o qual terá um efeito não somente no início da vida do animal, mas também apresentará um efeito duradouro persistindo ao longo da idade adulta (MEANEY, 2001; LEVINE, 2001). Neste trabalho, semelhantemente aos relatos da literatura (MEANEY, 2001), o método de determinação dos grupos experimentais com base nas frequências de lambidas obteve êxito e “n” amostral significativo para cada grupo. No entanto, não foi encontrada correlação do comportamento de lambar com o comportamento de amamentação em dorso arqueado, em contraste com a maioria da literatura (CHAMPAGNE *et al.*, 2003; MEANEY, 2001; ZHANG *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2004; SZYF *et al.*, 2005). Isto pode ser devido a diferenças entre linhagens de ratos quanto ao cuidado materno (MOORE, 1997). Neste trabalho foi usada a linhagem Wistar, enquanto grande parte dos trabalhos a respeito das variações de cuidado materno usa a linhagem *Long Evans*. Este resultado, porém, está de acordo com um trabalho anterior com ratas Wistar desenvolvido em nosso grupo de pesquisa (URIARTE *et al.*, 2007). Evidentemente, o comportamento de lambida que ocorre ao mesmo tempo com o a amamentação em dorso arqueado, as MCs apresentam frequências significativamente maiores, diferença que é devida à maior frequência de lambidas. Entretanto, os outros tipos de cuidado materno mostram algumas correlações com o comportamento de lambida. Também foi observado neste trabalho que as mães PCs estiveram fora do ninho e tinham filhotes fora do ninho com uma frequência significativamente maior que as mães MCs. Isso é devido ao fato já estabelecido de que as ratas lactantes PCs demonstram menor qualidade de cuidado em relação aos seus filhotes, pois apresentam menor atividade em regiões hipotalâmicas implicadas no cuidado materno (CHAMPAGNE *et al.*, 2001; 2003b; FRANCIS *et al.*,

2000) e o componente motivacional do cuidado materno encontra-se também diminuído (CHAMPAGNE *et al.*, 2004).

Durante as duas primeiras semanas de vida do rato, as respostas ao estresse são menos acentuadas comparadas aos adultos – logo, esse período foi denominado como hiporresponsivo ao estresse (VÁZQUEZ, 1998; LEVINE, 2001). Contudo, DENT *et al.*, 2000, observaram que ocorre uma rápida (15-30 min) indução da transcrição do ARNm do CRH no PVN após um estressor brando (injeção salina). Estudos anteriores sugeriram que a resposta a um estímulo pode ser específica de estressor já no início da vida (WALKER *et al.*, 1986), ou seja, dependendo das características fisiológicas e psicológicas do tipo de estressor – como o estresse por frio, um potente estressor no período neonatal o qual pode ocorrer na natureza – os filhotes de ratos podem responder mais ao estresse com maiores níveis de CORT plasmática, por exemplo (YI & BARAM, 1994; LEVINE, 2000, BRUNSON *et al.*, 2001). Neste trabalho foi encontrada uma diferença significativa dos níveis plasmáticos da CORT aumentando em resposta ao estresse por frio em todos os grupos, o que está de acordo com estudos de estresse em filhotes (GRINO *et al.*, 1991, KUHN *et al.*, 1990). Porém, não foram encontradas diferenças entre machos e fêmeas no P13. Diferenças de gênero nos níveis da CORT somente ocorrem próximo à puberdade dos ratos, aproximadamente no P35 (HENNING, 1978).

Os estudos sobre os efeitos das variações de cuidado materno, de modo geral, estão restritos a estudar a prole na vida adulta (MEANEY, 2001; ZHANG *et al.*, 2006, ZHANG *et al.*, 2004; WEAVER *et al.*, 2001; CAMERON *et al.*, 2005). Neste trabalho os resultados apontam que, no P13, os níveis de CORT basais e induzidos por estresse de filhotes PC e MC não diferem entre si, ao contrário do que já foi encontrado na literatura em animais adultos (BRAKE *et al.*, 2000; MENARD & HAKVOORT, 2007). Isso indica que no PHRE



esses animais ainda não se diferenciaram quanto ao cuidado materno nas respostas da CORT quando expostos a um estressor, o que sugere que essas diferenças surgirão posteriormente no desenvolvimento. Os estímulos no início da vida podem induzir mudanças comportamentais e hormonais relacionadas ao estresse de forma duradoura, as quais não estão presentes em ratos machos e fêmeas imaturas (SEVERINO *et al.*, 2004). Diferenças endócrinas quanto ao estímulo da manipulação neonatal, por exemplo, são aparentes tão tarde quanto P24-P26 (MEANEY *et al.*, 1988).

A OT não apenas desempenha funções quanto ao cuidado materno, mas também nas reações ao estresse e no apego entre filhote e mãe (LANG *et al.*, 1983, JESOVÁ, 1996, NEUMANN *et al.*, 2000, MORICEAU & SULLIVAN, 2005, NELSON & PANKSEPP, 1998). Um estudo com ratos (PEDERSEN & BOCCIA, 2002) relatou que filhotes que foram lambidos e afagados freqüentemente por suas mães apresentam liberação de OT, o que está de acordo com nossos achados. Nossos resultados das dosagens de OT indicaram que os filhotes os quais receberam maiores freqüências de lambidas das mães (MCs), apresentaram os maiores níveis plasmáticos desse hormônio. Há poucos estudos quanto ao comportamento do filhote de procurar a mãe e a maioria envolve camundongos *knockout*. Filhotes *knockout* para o receptor mu-opiíode demonstraram menos vocalizações ultrasônicas quando separados da mãe e diminuíram a preferência pelo odor da mãe (MOLES *et al.*, 2004). Similarmente, um estudo preliminar usando camundongos *knockout* para OT revelou uma latência aumentada do filhote de rastejar até a mãe, quando separado dela (YOUNG *et al.*, 1997b). A partir desses trabalhos, podemos sugerir que as mães PCs tinham maiores freqüências de filhotes fora do ninho não só devido ao próprio comportamento delas, mas também ao dos filhotes que provavelmente apresentavam menor procura ao ninho, dado que os filhotes PCs possuem níveis mais baixos de OT plasmática.

Também pode ser sugerido que as mães PCs foram observadas com maior frequência fora do ninho comparadas às MCs não somente pelo próprio comportamento delas, mas provavelmente também devido ao comportamento de vocalização diminuído de seus filhotes quando afastados da mãe.

A falta de resposta ao estresse pode ser devido ao fato do sistema hipotalâmico-neurohipofiseal, o qual participa da relação da OT com o estresse, ainda não estar maduro (ENGELMANN *et al*, 2004, NEUMANN *et al*, 2000, LIBERZON & YOUNG, 1997a). É importante ser levado em conta que o sistema ocitocinérgico apresenta algumas peculiaridades em animais neonatos, por exemplo, padrão de expressão de receptores de OT é diferente no início do desenvolvimento (KRAMER *et al*, 2003, TRIBOLLET *et al*, 1989). A OT tem uma natureza estresse-específica, uma vez que é observado que sua resposta encontra-se aumentada para determinados tipos de estressores em ratos machos e fêmeas, tais como o estresse por imobilização, nado forçado e isolamento social, e não ao frio, conforme foi usado neste trabalho (LANG *et al*, 1983, INSEL & WINSLOW, 1991, GIBBS, 1984; NEUMANN *et al.*, 2000). Um dos hormônios que poderiam responder ao estresse frio seria a AVP, conforme já foi relatado em um trabalho com ratos no P10 (WALKER *et al.*, 1991).

Interessantemente, foi encontrada uma diferença na OT quanto ao gênero, sendo que os níveis de OT estão aumentados nos filhotes fêmeas. Já foram relatadas diferenças de gênero no sistema ocitocinérgico em animais adultos (CARTER *et al*, 1988, JEZOVÁ *et al*, 1996) e já foi encontrado dimorfismo sexual na expressão de receptores de OT no período neonatal (UHL-BRONNER *et al*, 2005). Os padrões temporais de secreção de esteróides gonadais durante o desenvolvimento são marcadamente diferentes entre machos e fêmeas, e é a testosterona testicular, secretada durante o período crítico do desenvolvimento, um

dos principais responsáveis pela diferenciação específica de gênero no encéfalo de mamíferos. Paradoxalmente, no entanto, essa ação organizadora da testosterona requer sua aromatização a estrogênio – exposição de estrogênio derivado da testosterona é responsável pela “masculinização”/”feminização” do encéfalo quanto à regulação da liberação de gonadotropina e ao comportamento sexual (PATCHEV *et al.*, 1995). Esse dimorfismo sexual do sistema ocitocinérgico no período neonatal deve-se às ações dos esteróides sexuais no início da vida (HIEMKE *et al.*, 1992). Logo, a atividade aumentada da OT encontrada nas fêmeas neonatas em nosso trabalho pode ser regulada pelo estrogênio (CHAMPAGNE *et al.*, 2001). Sugere-se que um dos fatores responsáveis pela preferência da mãe em lambar a região anogenital dos filhotes machos seria a presença de compostos relacionados a androgênios na urina do filhote, uma vez que os testículos já estão ativos em machos neonatos (MOORE & MORELLI, 1979).

Neste trabalho, não foi encontrada nenhuma diferença entre machos e fêmeas neonatos quanto à atividade monoaminérgica no hipotálamo e no hipocampo, independente do cuidado materno e do estresse. Diferenças sexuais nos níveis de 5-HT durante o período crítico do desenvolvimento do encéfalo são associadas com diferenças morfológicas sexuais na idade adulta, tais como distribuição das fibras imunorreativas à 5-HT na POA medial (PETERS, 1982). Alguns trabalhos (LADOSKY & GAZIRI, 1970; GUILIAN *et al.*, 1973) não encontraram diferenças sexuais nos níveis de 5-HT no prosencéfalo e mesencéfalo de ratos machos e fêmeas nos P1, P4 ou P8. No entanto, foram relatadas claras diferenças no P12, no qual os níveis de 5-HT foram consideravelmente maiores em fêmeas do que em machos. Outro trabalho (CRUZ & ORTEGA-CORONA, 1997) encontrou diferenças sexuais significativas nos níveis hipotalâmicos de 5-HT, os quais foram maiores em fêmeas do que em machos no P10. Esses achados sugerem diferentes papéis para a 5-

HT em machos e fêmeas, o que não é relatado com a DA e a NA, o que confirma a falta de diferenças de gênero na renovação da DA e nos níveis de NA no hipotálamo – quanto à NA, é importante levar em conta que os resultados encontrados podem ser devidos ao fato de que pudemos analisar somente os níveis do neurotransmissor, e não a sua renovação, uma vez que não foi possível dosar seus metabólitos. Contudo, os relatos acima não vão ao encontro dos nossos resultados quanto à renovação da 5-HT no hipotálamo. Resultados variados quanto à diferença de atividade serotoninérgica hipotalâmica em ratos machos e fêmeas pré-púberes são relatados na literatura: ratos machos, mas não fêmeas, com experiência de manipulação neonatal apresentaram níveis diminuídos (PETERS *et al.*, 1991), aumentados (SMYTHE *et al.*, 1994), ou sem diferença (PAPAIOANNOU *et al.*, 2002) na renovação da 5-HT hipotalâmica. Nossos resultados da renovação da 5-HT hipotalâmica estariam então mais de acordo com os encontrados por PAPAIOANNOU *et al.*, 2002. Diferenças de gênero quanto à atividade serotoninérgica no hipocampo são apenas relatadas em animais adultos (DROSSOPOULOU, 2004; DUFRESNE *et al.*, 2009). Da mesma forma, a atividade dopaminérgica hipotalâmica e hipocampal diferente entre machos e fêmeas são relatadas somente em animais adultos (DALLA *et al.*, 2008; DUCHESNE *et al.*, 2009). As diferenças de gênero no sistema dopaminérgico são aparentes apenas após a puberdade (McCORMICK *et al.*, 2002). Dimorfismos sexuais quanto à NA central são relatadas somente na vida adulta (CURTIS *et al.*, 2006), o que está de acordo com nossos resultados.

Além disso, algumas relações podem ser feitas sobre as monoaminas hipotalâmicas com nossos resultados obtidos com a OT plasmática. É sabido que as células no PVN são ativadas pelos terminais nervosos serotoninérgicos, os quais aumentam a secreção de OT. NA e 5-HT, duas monoaminas conhecidas por controlar a secreção de OT e AVP da neuro-

hipófise, também estão envolvidos na regulação da expressão de peptídeo no PVN e no SON do hipotálamo. Essas regulações podem ativar mecanismos complexos agindo nos níveis de ARNm ou de peptídeo (CONSIGLIO, 2006). Então, é possível relacionar a falta de efeito do estresse na atividade serotoninérgica e nos níveis de NA hipotalâmicos – conforme será discutido com mais detalhes posteriormente – com a ausência de elevações da OT no estresse. Contudo, não podemos comparar os dados obtidos das monoaminas centrais com a OT plasmática quanto às diferenças de gênero encontradas apenas na OT. Talvez pudéssemos encontrar alguma diferença de gênero nas monoaminas se tivéssemos analisado a hipófise.

Uma vez que não há muitos dados na literatura a respeito das respostas neuroquímicas envolvidas no estresse em animais neonatos, foi investigada a atividade das monoaminas em estruturas encefálicas relevantes no estresse, tais como hipotálamo e o hipocampo.

De acordo com BAFFI & PALKOVITS, 2000, a exposição de ratos adultos ao frio produz uma resposta termorreguladora coordenada através dos sistemas metabólicos, endócrinos, vegetativos e comportamentais. A POA, particularmente a subdivisão lateral do núcleo pré-óptico lateral e o núcleo pré-óptico mediano (periventricular) são considerados os “centros” da termorregulação. Ambos os estímulos de frio e calor evocam expressão de c-fos nos neurônios pré-ópticos. A POA recebe sinais térmicos da periferia através de aferentes sensoriais primários, os quais são retransmitidos por neurônios nas áreas medulares e pontinas termossensitivas. Os neurônios medulares termossensitivos ocupam áreas bem demarcadas imediatamente ventral e dorsal ao núcleo espinhal trigeminal, chamados núcleos peritrigeminais e paratrigeminais, respectivamente. Neurônios sensíveis ao frio estão presentes na parte dorsal da formação reticular pontina, a qual corresponde à

área termorreguladora pontina. Outra área que responde ao estresse por frio é a subdivisão lateral do núcleo do trato solitário. A resposta inicial à exposição aguda ao frio começa no hipotálamo. Ocorre um aumento na liberação do hormônio estimulador de tireotropina (TRH) do hipotálamo que, por sua vez, estimula a liberação de tireotropina (TSH) da adeno-hipófise, fazendo com que a glândula tireóide secrete seus hormônios (FREGLY, 1989). A secreção de TSH estimulada por frio pode ser modificada por vários neurotransmissores (MÄNNISTÖ, 1983). A importância da 5-HT é controversa, contudo a NA é um transmissor estimulatório na secreção de TRH e TSH, enquanto que a DA tem uma ação inibitória na liberação e/ou síntese de TRH e TSH (MÄNNISTÖ, 1983; MOURA & MOURA, 2004). Há fortes evidências sugerindo que a resposta à exposição ao frio é um estímulo estressante. Adicionalmente ao eixo HHA, alguns outros sistemas efetores podem ter um papel importante na manutenção da homeostase durante o frio. O frio agudo pode resultar em uma marcante elevação nos níveis de NA plasmática junto com elevação dos níveis de ACTH e CORT, além das mudanças nos níveis de CAs encefálicas em resposta ao estresse por frio já mencionado. Sugere-se que o sistema noradrenérgico central possa ter algum papel nas respostas induzidas pelo frio no PVN (BAFFI & PALKOVITS, 2000).

Apesar de filhotes de espécies altriciais como os ratos disporem de respostas termogênicas logo após o nascimento, são insuficientes para retardar a perda de calor. Em temperaturas baixas, a termogênese pelo tecido adiposo marrom contribui significativamente para as adaptações comportamentais e fisiológicas no frio (BLUMBERG & SOLOLOFF, 1998). Embora a liberação de TSH da hipófise seja controlada pelo TRH secretado do hipotálamo no período neonatal (P10), os controles centrais da secreção da TSH são imaturos neste estágio do desenvolvimento. Sugere-se que o controle opióide e dopaminérgico de liberação da TSH madurem antes da regulação

noradrenérgica nos ratos em desenvolvimento. A maturação tardia do mecanismo estimulatório noradrenérgico pode ser responsável pela ausência de aumento de secreção da TSH induzida por frio em neonatos (IGNAR & KUHN, 1988).

Neste trabalho não foi encontrado efeito do estresse por frio na renovação da 5-HT hipotalâmica. Pode-se pensar que a atividade serotonérgica hipotalâmica não é relevante nas respostas ao frio, pelo menos em animais no P13, já que a participação do sistema serotonérgico no frio não é clara (MÄNNISTÖ, 1983; MOURA & MOURA, 2004). Uma vez que a atividade dopaminérgica do controle do frio já está madura no PHRE (IGNAR & KUHN, 1988) e que a DA inibe as respostas do TRH e do TSH no frio (MÄNNISTÖ, 1983; MOURA & MOURA, 2004), é possível que a diminuição da renovação da DA hipotalâmica encontrada nos nossos resultados esteja exercendo uma função adaptativa quanto ao estressor usado em nossos animais no P13. A diminuição da atividade dopaminérgica poderia, então, estar levando à facilitação da liberação e/ou síntese de TRH e TSH no frio. A maturação tardia do sistema noradrenérgico na resposta ao frio mencionada anteriormente talvez explique a falta de efeito desse estresse nos níveis da NA hipotalâmica em nossos resultados. Contudo, essas hipóteses só poderiam ser comprovadas analisando a atividade do TRH e do TSH juntamente com a atividade monoaminérgica.

Desde muito tempo tem sido relatado na literatura que, de modo geral, um estresse agudo aumenta as relações de renovação das monoaminas no encéfalo (BALDESSARINI, 1972). No entanto, alguns trabalhos os quais analisaram determinados núcleos individuais do hipotálamo podem encontrar uma relação contrária. Em um experimento com animais adultos expostos agudamente a vapores de éter, foi relatada uma diminuição no metabolismo da 5-HT no PVN, SON e no núcleo arqueado caudal, enquanto que aumentos significantes do metabolismo da 5-HT foram encontrados no núcleo supraquiasmático e no

núcleo arqueado rostral (JOHNSTON *et al.*, 1985). Em um trabalho utilizando 20 min de imobilização, foi encontrada uma diminuição significativa de NA no núcleo ventromedial e no SON, assim como um aumento na NA no núcleo dorsomedial (KVETNANSKY *et al.*, 1977). É importante levar em conta que, em nosso trabalho, analisamos as monoaminas no hipotálamo inteiro, e não em núcleos específicos. A ausência de efeitos do estresse quanto à 5-HT e à NA pode ser o resultado do somatório de atividades antagônicas desses sistemas nos diferentes núcleos que compõem o hipotálamo. O trabalho de KVETNANSKY *et al.*, 1977, também encontrou uma diminuição de DA no núcleo arqueado, assim como um aumento na DA no núcleo dorsomedial. Logo, sugere-se que a atividade dopaminérgica do núcleo arqueado (A12), especificamente, esteja representando a atividade dopaminérgica hipotalâmica diminuída que encontramos no estresse. Seria interessante, para estudos posteriores, estudar a atividade monoaminérgica em núcleos individuais do hipotálamo para confirmar essas hipóteses.

A resposta dos neurônios dopaminérgicos ao estresse é dependente de vários fatores, incluindo a região encefálica, o gênero do indivíduo e o tipo de estressor (FLECKENSTEIN *et al.*, 1994). Vários estressores diminuem a atividade de neurônios dopaminérgicos TIs e periventriculares-hipofiseais, neurônios os quais inibem tonicamente a secreção de prolactina e peptídeos derivados da POMC, respectivamente (FLECKENSTEIN *et al.*, 1994). A exposição breve ao éter causa um aumento moderado na secreção de prolactina a qual é acompanhada por uma supressão transitória da atividade dos neurônios dopaminérgicos TIs (LOOKINGLAND *et al.*, 1990). Assim como a OT, a prolactina é potencialmente envolvida na atenuação da resposta do eixo HHA ao estresse (TILBROOK & CLARKE, 2006). O trabalho de FUXE *et al.* (1983) relatou que o estresse por 1h de imobilização induziu diminuição na renovação de DA na zona medial da



eminência média, a qual pode mediar o aumento da secreção de prolactina induzido por estresse. A DA liberada dos terminais dos neurônios TIs na eminência média é transportada via sistema portal hipotalâmico-hipofiseal para a adeno-hipófise onde ela se ligará a receptores estereoespecíficos nas células lactotrofas e inibirá a secreção de prolactina (DEMAREST *et al.*, 1985; MOORE *et al.*, 1987). A DOPAC é o metabólito predominante da DA na eminência média. As concentrações da forma livre desse metabólito refletem a relação do metabolismo de DA nos terminais dos neurônios TIs (LOOKINGLAND *et al.*, 1987). Baseado nesses estudos existe também a possibilidade de que o estresse usado em nosso trabalho tenha levado à diminuição da atividade dos neurônios dopaminérgicos TIs que, por sua vez, diminui a renovação da DA na eminência média, região a qual também poderia representar a renovação da DA diminuído que foi encontrado no hipotálamo. Esse mecanismo poderia levar à liberação de prolactina, a qual atuaria de modo adaptativo atenuando a resposta do eixo HHA ao estresse nos filhotes. Para confirmar essas hipóteses, seria necessário não só analisar a atividade dos neurônios TIs e da eminência média, mas também analisar os níveis de prolactina plasmática nos animais.

Estudos já indicaram que neurônios monoaminérgicos centrais podem ter sua atividade afetada por Gs (MOORE & BLOOM, 1979; PACAK *et al.*, 1995a; PACAK *et al.*, 2002). A hipercortisolemia crônica diminui os índices neuroquímicos de síntese e renovação de DA no Nacc, indicando que o excesso de Gs inibe a atividade dopaminérgica nessa região (PACAK *et al.*, 2002). O excesso de Gs também inibe a síntese e liberação de CRH no PVN e diminui a renovação da NA hipotalâmica (NAKAGAWA *et al.*, 1983; JHANWAR-UNIYAL *et al.*, 1989; PACAK *et al.*, 1995a,b). O trabalho de PACAK *et al.*, 1995a, demonstrou que os Gs diminuem a atividade catecolaminérgica basal e induzida por estresse no PVN, sugerindo que os Gs limitam a ativação do eixo HHA durante o estresse

pela atenuação da síntese e liberação de CA no PVN. Os autores sugerem que os Gs inibem a hidroxilação da tirosina – conseqüentemente, a biosíntese de CAs no PVN – via ações dos  $\alpha_2$ -adrenoceptores. Esses achados são consistentes com um papel intermediário das CAs na alça de retroalimentação negativa G-hipotálamo. Os ratos adultos hipercortisolêmicos utilizados nos estudos mencionados poderiam ser comparados aos ratos no período neonatal, pois mesmo que a concentração plasmática total de Gs seja baixa durante o PHRE, a concentração de sua forma biologicamente ativa é alta porque a maioria dos Gs está circulando no plasma na sua forma não-ligada à transcortina (HENNING, 1978; HADJIAN et al., 1975), o que contribui com a sensibilidade aumentada da retroalimentação negativa aos Gs durante esse período (GRINO *et al.*, 1991).

As células monoaminérgicas do encéfalo estão entre os locais nos quais o RG está presente em grandes quantidades, a concentração do RG nos núcleos é particularmente alta. Esses RGs, portanto, representam um importante local de ação de hormônios Gs secretados pelas adrenais, sugerindo uma possível ação genômica direta da CORT nos neurônios catecolaminérgicos (HÄRFSTRAND *et al.*, 1986). No entanto, os dados anatômicos de CZYRAK & CHOCYK, 2001, indicam que os RGs influenciam a neurotransmissão dopaminérgica na VTA e na substância nigra por um mecanismo indireto, o qual possivelmente envolve neurotransmissor intermitente. Nos grupos de células dopaminérgicas hipotalâmicas, todos os neurônios dopaminérgicos no núcleo arqueado (grupo celular A12), a maioria das células na zona incerta (A13) e todas as células do hipotálamo periventricular (A14) demonstram imunorreatividade moderada à forte para o RG, mas nenhuma das grandes células dopaminérgicas do hipotálamo posterior (A11) demonstrou tal imunorreatividade. No mesencéfalo, 40% a 75% das células dopaminérgicas

expressam o RG. As células A10 na VTA apresentam forte imunorreatividade (HÄRFSTRAND *et al.*, 1986), sendo que os RGs estão presentes em neurônios e células gliais em quantidades comparáveis (CZYRAK & CHOCYK, 2001). A grande maioria dos corpos celulares noradrenérgicos dos grupos A1-A7 e os corpos celulares serotoninérgicos dos grupos B1-B9 apresentam forte imunorreatividade para o RG (HÄRFSTRAND *et al.*, 1986). Sugere-se que os sistemas monoaminérgicos do tronco encefálico que se projetam difusamente e responsivos ao estresse envolvidos na regulação de, entre outras coisas, sono-vigília, comportamentos emocionais, funções neuroendócrinas e cardiovasculares e humor estão sob influência dos hormônios Gs circulantes. Deste modo, os neurônios catecolaminérgicos e serotoninérgicos do encéfalo representam importantes sistemas adaptativos para o indivíduo (HÄRFSTRAND *et al.*, 1986). Podemos então nos valer desses dados para lançar outra hipótese em relação aos nossos achados, a qual seria a de um possível papel dos altos níveis de CORT biologicamente ativa no PHRE na atenuação das respostas das monoaminas hipotalâmicas e hipocampais ao estresse. Isso poderia também explicar o fato de que o estresse induziu diminuição na atividade dopaminérgica hipotalâmica e não modificou a atividade serotoninérgica e os níveis de NA, e também a falta de efeito do estresse na atividade serotoninérgica e nos níveis de NA no hipocampo – apesar de a inervação noradrenérgica hipocampal ser uma das aferências mais precoces para esta estrutura (LOY & MOORE, 1979), a qual provém exclusivamente do LC, cujos neurônios são gerados entre E11 e E13. A CORT poderia, então, estar ligando-se em RGs nos neurônios monoaminérgicos, afetando a liberação dos seus neurotransmissores no hipotálamo e no hipocampo. Podemos sugerir que, por exemplo, a atividade dopaminérgica hipotalâmica diminuída que encontramos possa ser um dos possíveis mecanismos envolvidos na hiporresponsividade ao estresse em neonatos. Contudo, estudos posteriores

de imunistoquímica dos RGs e da atividade dos neurônios monoaminérgicos precisariam ser feitos, por exemplo, nos neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos A12 a A14 e na VTA para confirmar esta hipótese.

Quanto ao efeito central do cuidado materno, o único porém importante resultado encontrado neste trabalho foi da renovação da 5-HT aumentado no hipocampo de filhotes MCs. Esse resultado está de acordo com a literatura, pois já foi relatado que a estimulação tátil pelo cuidado da mãe ativa vias serotoninérgicas ascendentes do núcleo da rafe dos filhotes (SMYTHE *et al.*, 1994). Esse mecanismo levará a maior expressão de RGs no hipocampo dos filhotes (CHAMPAGNE & CURLEY, 2009), o que conferirá aos animais MCs uma retroalimentação negativa mais eficiente na vida adulta (SILVEIRA *et al.*, 2007). Experimentos com manipulações no início da vida também constataram que há alteração dos sistemas serotoninérgicos hipocampais e corticais em filhotes de ratos (SMYTHE *et al.*, 1994). Breves episódios de manipulação aumentam a renovação de 5-HT e a concentração de 5-HIAA em regiões do encéfalo do rato neonato onde a expressão de RG é alterada, tais como o hipocampo e o córtex frontal, sem efeito em regiões onde a expressão de RG não é afetada, tais como hipotálamo e a amígdala (SMYTHE *et al.*, 1994). O efeito da 5-HT na expressão de RG no hipocampo parece ser mediado pelo receptor 5-HT<sub>2</sub>. A manipulação não tem efeitos a longo prazo na renovação de 5-HT hipocampal e do córtex frontal e está associada com a diminuição nas concentrações de 5-HT. O conteúdo de 5-HT hipocampal aumenta durante as três primeiras semanas de vida, um padrão temporal que é notavelmente similar àquele visto tanto para a expressão de ARNm para RG quanto para densidade do receptor (SMYTHE *et al.*, 1994). Essas informações demonstram a importância dos efeitos das estimulações mediados pela 5-HT no desenvolvimento da expressão de RG, sugerindo que o papel da 5-HT é singular no início do desenvolvimento. A ausência de efeito do

cuidado materno nas monoaminas hipotalâmicas nos nossos animais no P13 indica que esse efeito só ocorrerá na vida adulta.

A despeito das hipóteses formuladas acima para discutir os resultados obtidos neste trabalho, é importante levar em conta também que o número reduzido de amostras em alguns grupos, possivelmente, representou um viés para os achados. Trabalhos posteriores são necessários para aumentar o número da amostra, permitindo que sejam feitas interpretações mais seguras a respeito da real natureza dos processos estudados.

## *6. Conclusões*

---

Foi concluído que:

- As ratas lactantes Wistar apresentam diferenças individuais de cuidado materno, principalmente quanto ao comportamento de lambida.

- Apesar dos ratos neonatos estarem no PHRE, os filhotes apresentam uma resposta significativa da CORT provocado por um estressor, sendo que neste caso, ao frio.

- Diferenças de gênero quanto aos níveis basais e induzidos por estresse da CORT ainda não ocorreram no PHRE dos animais estudados.

- Diferenças quanto ao cuidado materno dos níveis basais e induzidos por estresse de CORT não ocorrem no PHRE. Essas modificações podem surgir numa fase posterior do desenvolvimento.

- A falta de resposta da OT ao estresse em filhotes pode ser devida ao fato de que o sistema hipotalâmico-neurohipofiseal ainda não estar maduro o suficiente, e também ao fato de que a OT apresenta pouca resposta ao tipo de estressor usado – o frio, mesmo em animais neonatos, o qual é considerado um forte estressor para filhotes.

- A OT aumentada nos filhotes fêmeas comparada aos machos indica um dado interessante de que algumas diferenças sexuais hormonais já são encontradas no período neonatal.

- A OT aumentada nos filhotes MCs indica que maiores frequências de cuidado materno induzem maior liberação do hormônio na prole, o que está correlacionado com a interação mãe-filhote.

- A atividade serotoninérgica avaliada no hipotálamo inteiro não é modificada por estresse, gênero (ao contrário com alguns achados na literatura) ou por diferentes intensidades de cuidado materno em ratos Wistar no P13.

- A atividade dopaminérgica avaliada no hipotálamo inteiro é responsiva ao estresse em ratos no P13.

- A falta de diferenças quanto ao gênero e ao cuidado materno na atividade dopaminérgica hipotalâmica nos ratos no P13 indicam que essas modificações podem surgir posteriormente.

- A atividade serotonérgica hipocampal aumentada nos filhotes MCs está intimamente ligada aos maiores intensidades de cuidado materno recebido – especialmente devido ao comportamento de lambida aumentado nas mães MCs. Este resultado está de acordo com outros estudos com diferenças de cuidado materno e com manipulação neonatal.

- A falta de diferença na atividade da 5-HT hipocampal quanto ao gênero e ao estresse nos ratos no P13 indica que essas modificações podem surgir posteriormente na vida.

- Nos ratos no P13, não encontramos diferença em nenhum dos fatores – cuidado materno, gênero e estresse – nos níveis de NA hipotalâmica e hipocampal.



## *7. Referências*

---

ABERCROMBIE, E.D., Jacobs, B.L. 1987a. Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats: I. Acutely presented stressful and non stressful stimuli. *J. Neurosci.*, 7: 2837– 2843.

ABERCROMBIE, E.D., Jacobs, B.L. 1987b. Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats: II. Adaptation to chronically presented stressful stimuli. *J. Neurosci.*, 7: 2844– 2848.

ABERCROMBIE, E.D., Keller, R.W., Zigmond, M.J. 1988. Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies. *Neurosci.*, 27: 897-904.

AGRAWAL, H. C., Glisson, S. N., Himwich, W. A. 1966. Changes in monoamines of rat brain during postnatal ontogeny. *Biochim. Biophys. Acta*, 130: 511-513.

AGUIAR, C.E., Cadore, L.P., Padoin, M.J., Barbosa-Coutinho, L.M., Lucion, A.B. 1997. Aversive stimulation during the stress-hyporesponsive period does not affect the number of corticotroph cells in neonatal male rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30: 1463-1466.

AMIRAGOVA, M.G. 1985. Neurophysiological analysis of the development of endocrine and hypertensive reactions in prolonged emotional stress. *Brain Res.*, 344: 303–315.

ANAND, B.K., Dua, S. 1956. Circulatory and respiratory changes induced by electrical stimulation of limbic system (visceral brain). *J. Neurophysiol.*, 19: 393-400.

ANDA, R.F., Felitti, V.J., Bremner, J.D., Walker, J.D., Whitfield, C., Perry, B.D., Dube Sh., R., Giles, W.H. 2006. The enduring effects of abuse and related adverse experiences in childhood: a convergence of evidence from neurobiology and epidemiology. *Eur. Arch. Psych. Clin. Neurosc.*, 256: 174-186.

ANGELUCCI, L., Patacchioli, F.R., Chicriechetti, C., Laureti, S. 1983. Changes in behavior and brain glucocorticoid receptor detected in adult life of corticosterone nursed rats. In Zhinden, G., Cuomo, V., Racagni, G., Weiss, B.: *Application of Behavioral Pharmacology in Toxicology*: 277-291.

ARMSTRONG, W.E. 1995. Hypothalamic Supraoptic and Paraventricular Nuclei. In Paxinos, G.: *The Rat Nervous System*: 377-390.

BAFFI, J.S., Palkovits, M. 2000. Fine Topography of Brain Areas Activated by Cold Stress. *Neuroendocr.*, 72: 102-113.

BALDESSARINI, R.J. 1972. Biogenic amines and behavior. *Ann. Rev. Med.*, 23: 343-354.

BARTOVÁ, A. 1968. Functioning of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal System during Postnatal Development in Rats. *Gen. Comp. Endocr.*, 10: 235-239.

BEIKO, J., Lander, R., Hampson, E., Boon, F., Cain, D.P. 2004. Contribution of sex differences in the acute stress response to sex differences in water maze performance in the rat. *Behav Brain Res.*, 151: 239–53.

BERMAN, C. 1990. Intergenerational transmission of maternal rejection rates among free-ranging rhesus monkeys on Cayo Santiago. *Anim. Behav.*, 44: 247–258.

BERRIDGE, C.W., Waterhouse, B.D. 2003. The locus coeruleus– noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res. Rev.*, 42: 33–84.

BISCHOFF, S., Scatton, B., Korf, J. 1979. Biochemical evidence for a transmitter role of dopamine in the rat hippocampus. *Brain Res.*, 165: 161-165.

BJÖRKSTRAND, E.M., Eriksson, M., Uvnäs-Moberg, K. 1992. Plasma levels of oxytocin after food deprivation and hypoglycaemia, and effects of 1-deamino-2-D-Tyr-(Oet)-4-Thr-8-Orn-oxytocin on blood glucose in rats. *Acta Physiol. Scand.*, 144: 355-359.

BLANCHARD, D.C., Shepherd, J.K., De Padua, C.A., Blanchard, R.J. 1991. Sex effects in defensive behavior: baseline differences and drug interactions. *Neurosc. Biobehav. Rev.*, 15: 461–8.

BLUMBERG, M. S., Sokoloff, G. 1998. Thermoregulatory Competence and Behavioral Expression in the Young of Altricial Species – Revisited. *Dev. Psychobiol.*, 33: 107-123.

BOROWSKY, B., Kuhn, C. M. 1990. Central D1 and D2 dopamine receptors stimulate hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) activity. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 16: 1178.

BOROWSKY, B., Kuhn, C. M. 1991a. Chronic cocaine administration sensitizes behavioral but not neuroendocrine responses. *Brain Res.*, 543: 301-306.

BOROWSKY, B., Kuhn, C. M. 1991b. Monoamine mediation of cocaine-induced hypothalamo-pituitary-adrenal activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 256: 204-10.

BOROWSKY, B., Kuhn, C. M. 1991c. The role of dopamine neuronal systems in the regulation of hypothalamo pituitary-adrenal activity. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 17: 991.

BOROWSKY, B., Kuhn, C.M. 1992. D1 and D2 dopamine receptors stimulate hypothalamo-pituitary-adrenal activity in rats. *Neuropharmacol.*, 31: 671-678.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

BRAKE, W. G., Flores, G., Francis, D., Meaney, M. J., Srivastava, L.K., Gratton, A. 2000. Enhanced nucleus accumbens dopamine and plasma corticosterone stress responses in adult rats with neonatal excitotoxic lesions to the medial prefrontal cortex. *Neurosci.* 96: 687-695.

BRAKE, W. G., Zhang, T. Y., Diorio, J., Meaney, M. J., Gratton, A. 2004. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur. J. Neurosci.*, 19: 1863-1874.

BREDY, T. W., Grant, R. J., Champagne, D.L., Meaney, M. J. 2003. Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 18: 2903–2909.

BRITTON, K.T., Segal, D.S., Kuczenski, R., Hauger, R. 1992. Dissociation between in vivo hippocampal norepinephrine response and behaviorall neuroendocrine responses to noise stress in rats. *Brain Res.*, 574: 125-130.

BROWN, C. M., MacKinnon, A. C., McGrath, J. C., Spedding, M., Kilpatrick, A. T. 1990. Adrenoceptor subtypes and imidazoline-like binding sites in the rat brain. *Br. J. Pharmac.* 99: 803-809.

BRUNSON, K.L., Avishai-Eliner, S., Hatalski, C.G., Baram, T.Z. 2001. Neurobiology of the stress response early in life: evolution of a concept and the role of corticotrophin releasing hormone. *Mol Psychiatry*, 6: 647-656.

BURGESS, L. H., Handa, R. J. 1992. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinol.*, 131:1261–1269.

CALDJI, C., Francis, D., Sharma, S., Plotsky, P.M., Meaney, M.J. 2000. The effects of early rearing environment on the development of GABA<sub>A</sub> and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharm.*, 22: 219–229.

CALDJI, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P. M., Meaney, M. J. 1998. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Neurobiol*, 95: 5335-5340.

CALOGERO, A.E., Gallucci, W.T., Gold, P.W., Chrousos, G.P. 1988. Multiple feedback regulatory loops upon rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion. Potential clinical implications. *J. Clin. Invest.*, 82: 767– 774.

CAMERON, N.M., Champagne, F.A., Parent, C., Fish, E.W., Ozaki-Kuroda, K., Meaney, M.J. 2005. The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Neurosci. Biobehav.Rev.*, 29: 843-865.

CARRASCO, A.C., Van De Kar, L.D. 2003. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharm.*, 463: 235-272.

CARTER, C. S. 2005. The chemistry of child neglect: Do oxytocin and vasopressin mediate the effects of early experience? *PNAS*, 102: 18247-18248.

CARTER, D.A., Lightman, S.L. 1986. Diurnal pattern of stress-evoked neurohypophyseal hormone secretion: sexual dimorphisms in rats. *Neurosci. Lett.*, 71: 252-255.

CARTER, D.A., Saridaki, E., Lightman, S.L. 1988. Sexual differentiation of oxytocin stress responsiveness: effect of neonatal androgenization, castration and a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist. *Acta Endocrin.*, 117: 525-530.

CASOLINI, P., Kabbaj, M, Frederic, L, Piazza, P. V., Rougé-Pont, F., Angelucci, L., Simon, H., Le Moal, M., Maccari, S. 1993. Basal and stress-induced corticosterone secretion is decreased by lesion of mesencephalic dopaminergic neurons. *Brain Res.*, 622: 311-314.



CASSENS, G., Kuruc, A., Roffman, M., Orsulak, P.J., Schildkraut, J.J. 1981. Alterations in brain norepinephrine metabolism and behavior induced by environmental stimuli previously paired with inescapable shock. *Behav. Brain Res.*, 2: 387–407.

CASSENS, G., Roffman, M., Kuruc, A., Orsulak, P. J., Schildkraut, J. J. 1980. Alterations in brain norepinephrine metabolism induced by environmental stimuli previously paired with inescapable shock. *Science*, 209: 1138–1140.

CARVIN, C. D., Parr, R. D., Kladde, M. P. 2003. Site-selective in vivo targeting of cytosine-5 DNA methylation by zinc-finger proteins. *Nucl. Ac. Res.*, 31: 6493-6501.

CHAMPAGNE, F. A., Chretien, P., Stevenson, C.W., Zhang, T. Y., Gratton, A., Meaney, M. J. 2004. Variations in nucleus accumbens dopamine associated with individual differences in maternal behavior in the rat. *J. Neurosci.*, 24: 4113–4123.

CHAMPAGNE, F. A., Curley, J. P. 2009. Epigenetic mechanisms mediating the long-term effects of maternal care on development. *Neurosc. Biobehav. Rev.*, 33: 593-600.

CHAMPAGNE, F. A., Diorio, J., Sharma, S., Meaney, M. J. 2001. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *PNAS*, 98: 12736-12741.

CHAMPAGNE, F. A., Francis, D. D., Mar, A., Meaney, M. J. 2003a. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol. Behav.*, 79: 359-371.

CHAMPAGNE, F. A., Weaver, I. C. G., Diorio, J., Sharma, S., Meaney, M. J. 2003b. Natural Variations in Maternal Care Are Associated with Estrogen Receptor  $\alpha$  Expression and Estrogen Sensitivity in the Medial Preoptic Area. *Endocrinol.*, 144: 4720-4724.

CHAMPAGNE, F. A., Weaver, I. C., Diorio, J., Dymov, S., Szyf, M., Meaney, M. J. 2006. Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor- $\alpha$ 1b promoter and estrogen receptor- $\alpha$  expression in the medial preoptic area of female offspring. *Endocr.* 147: 2909–2915.

CHATELAIN, A., Boudouresque, F., Chautard, T., Dupouy, J. P., Oliver, C. 1988. Corticotrophin-releasing factor immunoreactivity in the hypothalamus of the rat during the perinatal period. *J. Endocrinol.*, 119: 59-64.

CHEUNG, S., Ballew, J. R., Moore, K. E., Lookigland, K. J. 1998. Contribution of dopamine neurons in the medial zona incerta to the innervation of the central nucleus of the amygdala, horizontal diagonal band of Broca and hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.*, 808: 174–181.

CHROUSOS, G. P., Gold, P. W. 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, 267: 1244–1252.

CONNOR, T. J., Kelly, J. P., Leonard, B. E. 1997. Forced swim test-induced neurochemical, endocrine, and immune changes in the rat. *Pharm. Biochem. Behav.* 58: 961-967.

CONSIGLIO, A.R. 2006. Depression Under the Perspective of Oxytocin. *C.N.S. Agents in Med. Chem.*, 6: 293-310.

CORRODI, H., Fuxe, K., Hokfelt, T. 1968. The effect of immobilization stress on the activity of central monoamine neurons. *Life Sci.*, 7: 107-112.

CRINE, A. F., Bujis, R. M. 1987. Electric footshocks differentially affect plasma and spinal cord vasopressin and oxytocin levels. *Peptides*, 8: 243-246.

CRITCHLOW, V., Liebelt, A., Barsela, M., Mountcastle, W., Lipscomb, H.S. 1963. Sex differences in resting pituitary–adrenal function in the rat. *Am. J. Physiol.*, 205: 807–815.

CUI, Z.-H., Ikeda, K., Kawakami, K., Gonda, T., Masuda, J., Nabika, T. 2004. Exaggerated response to cold stress in a congenic strain for the quantitative trait locus for blood pressure. *J. Hypert.*, 22: 2103-2109.

CULLINAN, W. E., Herman, J. P., Watson, S. J. 1993. Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Comp. Neurol.*, 332: 1 – 20.

CUNNINGHAM, Jr. E. T., Sawchenko, P. E. 1988. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.*, 274: 60– 76.

CURET, O., de Montigny, C. 1988. Electrophysiological characterization of adrenoceptors in the rat dorsal hippocampus. I. Receptors mediating the effect of microiontophoretically-applied norepinephrine. *Brain Res.*, 475: 3546.

CURET, O., de Montigny, C. 1989. Electrophysiological characterization of adrenoceptors in the rat dorsal hippocampus. III. Evidence for the physiological role of terminal adrenergic autoreceptors. *Brain Res.*, 499: 18-26.

CURET, O., Dennis, T., Scatton, B. 1987. Evidence for the involvement of presynaptic alpha2 adrenoceptors in the regulation of norepinephrine metabolism in the rat brain. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 240: 327-336.

CURTIS, A. L., Bethea, T., Valentino, R.J. 2006. Sexually dimorphic responses of the brain norepinephrine system to stress and corticotrophin-releasing factor. *Neuropsychopharm.* 31: 544-554.

CURTIS, A. L., Pavcovich, L. A., Grigoriadis, D. E., Valentino, R. J. 1995. Previous stress alters corticotropin-releasing factor neurotransmission in the locus coeruleus. *Neurosci.*, 65: 541–550.

CURTIS, A.L., Pavcovich, L.A., Valentino, R.J. 1999. Long-term regulation of locus coeruleus sensitivity to corticotropin-releasing factor by swim stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 289: 1211–1219.

CURTIS, A. L., Valentino, R. J. 1994. Corticotropin-releasing factor neurotransmission in locus coeruleus: a possible site of antidepressant action. *Brain Res. Bull.*, 35: 581– 587.

CURTIS, G.C., Abelson, J.L., Gold, P.W. 1997b. Adrenocorticotrophic hormone and cortisol responses to corticotropin-releasing hormone: changes in panic disorder and effects of alprazolam treatment. *Biol. Psych.*, 41: 76–85.

CZYRAK, A., Chocyk, A. 2001. Search for the presence of glucocorticoid receptors in dopaminergic neurons of rat ventral tegmental area and substantia nigra. *Pol. J. Pharmacol.*, 53: 681–684.

DAHLSTROM, A., Fuxe, K. 1965. Evidence for the existence of monoaminecontaining neurons in the central nervous system IV. *Acta Physiol. Scand.*, 64: 1–36.

DALLA, C., Antoniou, K., Kokras, N., Drossopoulou, G., Papathanasiou, G., Bekris, S., Daskas, S., Papadopoulou-Daifoti, Z. 2008. Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission. *Physiol. Behav.*, 93: 595-605.

DALLMAN, M.F., Akana, S.F., Scribner, K.S., Pecoraro, N., La Fleur, S.E., Houshyar, H., Gomez, F. 2004. Chronic stress-induced effects of corticosterone on brain: direct and indirect. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1018:141-150.

DAVIS, M., Hitchcock, J.M., Bowers, M.B., Berridge, C.W., Melia, K.R., Roth, R.H. 1994a. Stress-induced activation of prefrontal cortex dopamine turnover: blockade by lesions of the amygdala. *Brain Res.*, 664: 207– 210.

DAVIS, M., Rainnie, D., Cassell, M. 1994b. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci.*, 17: 208– 214.

DE KLOET, E. R. 1995. Steroids, stability and stress. *Front. Neuroendocrinol.*, 16: 416– 425.

DE KLOET, E. R., Voorhuis, T.A.M., Elands, J. 1985. Estradiol induces oxytocin binding in the rat hypothalamic ventromedial nucleus. *Eur. J. Pharmacol.*, 118: 185-186.

DE KLOET, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., Joels, M. 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr. Rev*, 19: 269-301.

DE KLOET, E. R., Sybesma, H., Reul, H. M. H. M. 1986. Selective control by corticosterone of serotonin receptor capacity in raphe – hippocampal system. *Neuroendocrinol.*, 42: 513– 521.

Del OLMO, E., Pazos, A. 2001. Aminergic receptors during the development of the human brain: the contribution of in vitro imaging techniques. *J. Chem. Neuroanat.*, 22: 101-114.

DEMAREST, K. T., Moore, K. E., Riegle, G. D. 1985. Acute Restraint Stress Decreases Dopamine Synthesis and Turnover in the Median Eminence: A Model for the Study of the Inhibitory Neuronal Influences on Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons. *Neuroendocrinol.*, 41: 437-444.

DENENBERG, V. H. 1999. Commentary: Is Maternal Stimulation the Mediator of Handling Effect in Infancy? *Dev. Psychobiol.*, 34: 1-3.

DENT, G. W., Smith, M. A., Levine, S. 2000. Rapid induction of corticotropin-releasing hormone gene transcription in the paraventricular nucleus of the developing rat. *Endocr.*, 141: 1593-1598.

DENT, G. W., Smith, M. A., Levine, S. 2001. Stress-induced alterations in locus coeruleus gene expression during ontogeny. *Dev. Brain Res.*, 127: 23-30.

DROSSOPOULOU, G., Antoniou, K., Kitraki, E., Papathanasiou, G., Papalexi, E., Dalla, C., Papadopoulou-Daifoti, Z. 2004. Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. *Neurosci.*, 126: 849-857.

DUBE, S.R., Felitti, V.J., Dong, M., Chapman, D.P., Giles, W.H., Anda, R.F. 2003. Childhood abuse, neglect, and household dysfunction and the risk of illicit drug use: the adverse childhood experiences study. *Pediatr.*, 111: 564-572.

DUCHESNE, A., dufresne, M. M., Sullivan, R. M. 2009. Sex differences in corticolimbic dopamine and serotonin systems in the rat and the effect of postnatal handling. *Prog. Neuro-Psychoph. Biol. Psych.*, 33: 251-261.

DUNN, A. J. 1988a. Stress-related activation of cerebral dopaminergic systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 537: 188-205.

DUNN, A. J. 1988b. Stress-related changes in cerebral catecholamine and indolamine metabolism: Lack of effect of adrenalectomy and corticosterone. *J. Neurochem.*, 51: 406–412.



DUNN, A. J. 1988c. Changes in plasma and brain tryptophan and brain serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid after footshock stress. *Life Sci.*, 42: 1847-1853.

DUNN, A. J., Berridge, C. W. 1987. Corticotropin-Releasing Factor administration elicits a stress-like activation of cerebral catecholaminergic systems. *Pharm. Biochem. Behav.*, 27: 685-691.

EATON, M. J., Cheung, S., Moore, K.F., Lolingland, K.J. 1996. Dopamine receptor-mediated regulation of corticotrophin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.*, 738: 60-66.

ELAM, E., Yao, T., Svensson, T.H., Thoren, P. 1984. Regulation of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves by cardiovascular afferents. *Brain Res.* 290: 281-287.

ENCIO, IJ, Detera-Wadleigh, SD. 1991. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.*, 266: 7182-7188.

EVANS, R.M., Arriza, J.L. 1989. A molecular framework for the actions of glucocorticoid hormones in the nervous system. *Neuron*, 2: 1105-1112.

FAIRBANKS, L.A. 1989. Early experience and cross-generational continuity of mother–infant contact in vervet monkeys. *Dev. Psychobiol.*, 22: 669–681.

FELDMAN, S., Conforti, N., Chowers, I. 1975. Adrenocortical responses following sciatic nerve stimulation in rats with partial hypothalamic deafferentations. *Acta Endocrinol.*, 80: 625– 629.

FINK, G., Sumner, B. E. H., McQueen, J. K., Wilson, H., Rosie, R. 1998. Sex steroid control of mood, mental state and memory. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 25: 764– 775.

FLECKENSTEIN, A. E., Lookingland, K. J., Moore, K. E. 1994. Differential role of histamine in mediating stress-induced changes in central dopaminergic neuronal activity in the rat. *Brain Res.*, 653: 267-272.

FLEMING, A. S., Kraemer, G. W., Gonzalez, A., Lovic, V., Rees, S., Melo, A. 2002. Mothering begets mothering: the transmission of behavior and its neurobiology across generations. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 73: 61–75.

FLEMING, A. S., Steiner, M., Corter, C., 1997. Cortisol, hedonics, and maternal responsiveness in human mothers. *Horm. Behav.*, 32: 85–98.

FRANCIS, D. D., Caldji, C., Champagne, F., Plotsky, P. M., Meaney, M. J. 1999a. The role of corticotropin-releasing factor–norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress. *Biol. Psych.*, 46: 1153–1166.

FRANCIS, D. D., Champagne, F. C., Meaney, M. J. 2000. Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *J. Neuroendocr.* 12: 1145-1148.

FRANCIS, D. D., Diorio, J., Liu, D., Meaney, M. J. 1999b. Nongenomic transmission across generations in maternal behavior and stress responses in the rat. *Science.*, 286: 1155-1158.

FRANCIS, D. D., Young, L. J., Meaney, M. J., Insel, T. R. 2002. Naturally Occurring Differences in Maternal Care are Associated with the Expression of Oxytocin and Vasopressin (V1a) Receptors: Gender Differences. *J. Neuroendocr.*, 14: 349-353.

FREGLY, M. J. 1989. Activity of the hypothalamic-pituitary thyroid axis during exposure to cold. *Pharmacol. Ther.*, 41: 85-142.

FRIES, A. B. W., Ziegler, T. E., Kurian, J. R., Jacoris, S., Pollak, S. D. 2005. Early experience in humans is associated with changes in neuropeptides critical for regulating social behavior. *PNAS*, 102: 17237-17240.

FUXE, K., Anderson, K., Eneroth, P., Siegel, R. A., Agnati, L. F. 1983. Immobilization stress-induced changes in discrete hypothalamic catecholamine levels and turnover, their modulation by nicotine and relationship to neuroendocrine function. *Acta Physiol. Scand.*, 117: 421-426.

GAMARO, G. D., Manoli, L. P., Torres, I. L. S., Silveira, R., Dalmaz, C. 2003. Effects of chronic variable stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem. Intern.*, 42: 107-114.

GESING, A., Bilang-Bleuel, A., Droste, S.K., Linthorst, A.C.F., Holshoer, F., Reul, J.M.H.M. 2001. Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotrophin-releasing hormone. *J. Neurosci.*, 21: 4822-4829.

GIBBS, D.M. 1984. Dissociation of oxytocin, vasopressin and corticotropin secretion during different types of stress. *Life Sci.*, 35: 487-491.

GIOVENARDI, M., Consiglio, A. R., Barros, H. M. T., Lucion, A. B. 2000. Pup age and aggressive behavior in lactating rats. *Braz. J. Méd. Res.*, 33: 1083-1088.

GOLDIM, J. R., Raymundo, M. M. 1997. *Pesquisa em saúde e direitos dos animais*. 2.ed. Porto Alegre: Hospital de Clínicas/Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, 30p.

GOODWIN, R. D., Stein, M. B. 2004. Association between childhood trauma and physical disorders among adults in the United States. *Psychol. Med.*, 34: 509-520.

GORDON, R., Spector, S., Sjoerdsma, A., Udenfriend, S. 1966. Increased synthesis of norepinephrine and epinephrine in the intact rat during exercise and exposure to cold. *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 153: 440-447.

GRAEFF, F. G., Viana, M. B., Mora, P. O. 1997. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 21: 791-799.

GRAY, J. A. 1981. Anxiety as a paradigm case of emotion. *Br. Med. Bull.*, 37: 193-197.

GRAY, T. S., Carney, M.E., Magnuson, D.J. 1989. Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the hypothalamic paraventricular nucleus: possible role in stress-induced adrenocorticotropin release. *Neuroendocrinol.*, 50: 433-446.

GRAY, T. S. 1993. Amygdaloid CRF pathways. Role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 697: 53-60.

GRAY, T. S., Piechowski, R. A., Yracheta, J. M., Rittenhouse, P. A., Bethea, C .L., Van de Kar, L. D. 1993. Ibotenic acid lesions in the bed nucleus of the stria terminalis attenuate conditioned stress-induced increases in prolactin. *Neuroendocrinol.*, 57: 517-524.

GRINO, M., Boudouresque, F., Chautard, T., Becquet, D., Guillaume, V., Strbak, V., Olivier, C. 1991. Developmental Aspects of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in the Rat. *Endocr. Reg.*, 25: 36-43.

GUBERNICK, D. J., Alberts, J. R. 1983. Maternal licking of young: Resource exchange and proximate controls. *Physiol. Behav.*, 31: 593-601.

GUILIAN, D., Pohorecky, L. A., McEwen, B. S. 1973. Effects of gonadal steroids upon brain 5-hydroxytryptamine levels in the neonatal rat. *Endocr.*, 93: 1329-1335.

HABIB, K. F., Gold, P. W., Chrousos, G. P. 2001. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol. Met. Clin. North Am.*, 30: 695-728.

HADJIAN, A. J., Chedin, M., Cochet, C., Chambaz, E. M. 1975. Cortisol binding to proteins in plasma in the human neonate and infant. *Pediatr. Res.*, 9: 40-45.

HÄRFSTRAND, A., Fuxe, K., Cintra, A., Agnati, L. F., Zini, I., Wikström, A. C., Okret, S., Yu, Z. Y., Golstein, M., Steinbusch, H., Verhofstad, A., Gustafsson, J. A. Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 9779-9783.

HASHIMOTO, K. K., Mukami, K., Takao, T., Makino, S., Sugawara, M., Ota, Z. 1989. Effect of acute ether or restraint stress on plasma corticotrophin releasing hormone, vasopressin and oxytocin levels in the rat. *Acta Med. Okayama*, 43: 191-167.

HENNING, S. J. 1978. Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am. J. Physiol.*, 235: E451-456.

HERMAN, J.P., Cullinan, W.E. 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.*, 20: 78– 84.

HIEMKE, C., Markus, B., Kohsik, R., Hundt, M., Ghraf, R. 1992. Actions of sex hormones on the brain. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol.-Psych.*, 16: 377-388.

HIGUCHI, T., Honda, K., Negoro, H. 1986. Influence of oestrogen and noradrenergic afferent neurones on the response of LH and oxytocin to immobilization stress. *J. Endocr.*, 110: 245-250.

HIGUCHI, T., Honda, S., Takano, S., Negoro, H. 1990. Stress-induced oxytocin release in the rat after lesion of the paraventricular nuclei; possible deficiency of corticotrophin releasing factor. *J. Neuroendocr.*, 2: 647-651.

IGNAR, D. M., Kuhn, C. M. 1988. Relative ontogeny of opioid and catecholaminergic regulation of thyrotropin secretion in the rat. *Endocr.*, 123: 567-571.

IIMORI, K., Tanaka, M., Kohno, Y., Ida, Y., Nakagawa, R., Hoaki, Y., Tsuda, A., Nagasaki, N. 1982. Psychological stress enhances noradrenaline turnover in specific brain regions in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 16: 637-640.

IMHOF, J.T., Coelho, Z.M., Schmitt, M.L., Morato, G.S., Carobrez, A.P. 1993. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. *Behav. Brain Res.*, 56: 177-80.

IMPERATO, A., Angelucci, L., Casolini, P., Zocchi, A., Puglisi-Allegra, S. 1992. Repeated stressful experiences differently affect limbic dopamine release during and following stress. *Brain Res.*, 577: 194-199.

INOUE, T., Koyama, T., Muraki, A., Yamashita, I. 1993. Effects of single and repeated immobilization stress on corticotropin-releasing factor concentrations in discrete rat brain regions. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.*, 17: 161-170.

INOUE, T., Tsuchiya, K., Koyama, T. 1994. Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49: 911-920.

INSEL, T. R., Winslow, J. T. 1991. Central administration of oxytocin modulates the infant rat's response to social isolation. *Eur. J. Pharm.*, 203: 149-152.



INSEL, T. R., Winslow, J. T. 1998. Serotonin and Neuropeptides in Affiliative Behaviors. *Biol. Psych.*, 44: 207-219.

INSEL, T. R., YOUNG, L. J. 2000. Neuropeptides and the evolution of social behavior. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 10: 784-789.

IVÁNYI, T., Wiegant, V.M., de Wied, D. 1991. Differential effects of emotional and physical stress on the central and peripheral secretion of neurohypophysial hormones in male rats. *Life Sci.*, 48: 1309-1316.

JACOBSON, L., Sapolsky, R. 1991. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic pituitary adrenocortical axis. *Endocr. Rev.*, 12: 118-134.

JEZOVÁ, D., Juráková, E., Mosnarová, A., Kriska, M., Skultétyová, I. 1996. Neuroendocrine response during stress with relation to gender differences. *Acta Neurobiol. Exp.*, 56: 779-785.

JEZOVÁ, D., Michajvoskij, N., Kvetnansky, R., Makara, G.B. 1993. Paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus are not equally important for oxytocin release during stress. *Neuroendocrinol.*, 57: 776-781.

JEZOVÁ, D., Skultétyová, I, Tokarev, D.I., Bakos, P., Vígás, M. 1995. Vasopresin and Oxytocin in Stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 771: 192-293.

JHANWAR-UNIYAL, M., Renner, K. J., Bailo, M. T., Luine, V. N., Leibowitz, S. F. 1989. Corticosterone-dependent alterations on utilization of catecholamines in discrete areas of rat brain. *Brain Res.*, 500: 247-255.

JOCA, S. R. L., Ferreira, F. R., Guimarães, F. S. 2007. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitreergic neurotransmitter systems. *Stress*, 10: 227-249.

JOHNSON, E. O., Kamilaris, T. C., Chrousos, G. P., Gold, P. W. 1992. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosc. Biobehav. Rev.*, 16: 115-130.

JOHNSTON, A. L., File, S. E. 1991. Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol. Behav.*, 49: 245–250.

JOHNSTON, C. A., Spinedi, E. J., Negro-Vilar, A. 1985. Effect of acute ether stress on monoamine metabolism in median eminence and discrete hypothalamic nuclei of the rat brain and on anterior pituitary hormone secretion. *Neuroendocrinol.*, 41: 83-88.

JORDAN, S., Kramer, G. L., Zukhas, P. K., Petty, F. 1994. Previous stress increases in vivo biogenic amine response to swim stress. *Neurochem. Res.*, 19: 1521–1525.

KARANDREA, D., Kittas, C., Kitraki, E. 2000. Contribution of sex and cellular context in the regulation of brain corticosteroid receptors following restraint stress. *Neuroendocrinol.*, 71: 343–53.

KARANDREA, D., Kittas, C., Kitraki, E. 2002. Forced swimming differentially affects male and female brain corticosteroid receptors. *Neuroendocrinol.*, 75: 217–226.

KEHOE, P., Clash, K., Skipsey, K., Shoemaker, W. J. 1996. Brain Dopamine Response in Isolated 10-Day-Old Rats: Assessment Using D<sub>2</sub> Binding and Dopamine Turnover. *Pharmacol. Biochem.*, 53: 41-49.

KELLER, H. H., Bartholini, G., Pletscher, A. 1973. Spontaneous and drug-induced changes of cerebral dopamine turnover during postnatal development of rats. *Brain Res.*, 64: 371-378.

KITCHEN, I., Kelly, M., Turner, M. 1988. Dopamine receptor modulation of corticosterone secretion in neonatal and adult rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40: 580-581.

KITRAKI, F., Alexis, M.N., Papalopoulou, M., Stylianopoulou, F. 1996. Glucocorticoid receptor gene expression in the embryonic rat brain. *Endocrinol.*, 63: 305-317.

KLEIN, L.C., Corwin, E.J. 2002. Seeing the unexpected: how sex differences in stress responses may provide a new perspective on the manifestation of psychiatric disorders. *Curr Psychiatry Rep.*, 4: 441–448.

KOPIN, I.J. 1995. definitions of stress and sympathetic neuronal responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 771: 19-30.

KOOB, G. F. 1999. Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biol. Psych.*, 46: 1167– 1180.

KORF, J., Aghajanian, G.K., Roth, R.H. 1973. Stimulation and destruction of the locus coeruleus: opposite effects on 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol sulfate levels in the rat cerebral cortex. *Eur. J. Pharmacol.*, 21: 305– 310.

KORTE, S. M., Jaarsma, D., Luiten, P.G., Bohus, B. 1992. Mesencephalic cuneiform nucleus and its ascending and descending projections serve stress-related cardiovascular responses in the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 41: 157– 176.

KOSTEN, T. A., Zhang, X. Y., Kehoe, P. 2004. Infant rats with chronic neonatal isolation experience show decreased extracellular serotonin levels in ventral striatum at baseline and in response to cocaine. *Dev. Brain Res.*, 152: 19-24.

KOVACS, K. J. 1998. Functional neuroanatomy of the parvocellular vasopressinergic system: transcriptional responses to stress and glucocorticoid feedback. *Prog. Brain Res.*, 119: 31-43.

KRAEMER, G. W. 1992. A psychobiological theory of attachment. *Behav. Brain Sci.*, 15: 493-541.

KUDIŁKA, B. M., Kirschbaum, C. 2005. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol. Psychol.* 69: 113-32

KUHN, C. M., Paul, J., Schanberg, S. M. 1990. Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Dev. Psychobiol.*, 23: 395-410.

KVETNANSKY, R., Palkovits, M., Mitro, A., Torda, T., Mikulaj, L. 1977. Catecholamines in individual hypothalamic nuclei of acutely and repeatedly stressed rats. *Neuroendocrinol.*, 23: 257-267.

LABAN, O., Markovic, B. M., Dimitrijevic, M., Jankovic, B. D. 1995. Maternal deprivation and early weaning modulate experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Behav. Immunol.*, 9: 9-19.

LACHUER, J., Gaillet, S., Barbagli, B., Buda, M., Tappaz, M. 1991. Differential early time course activation of the brainstem catecholaminergic groups in response to various stresses. *Neuroendocr.*, 53: 589-596.

LADOSKY, W., Gaziri, L., 1970. Brain serotonin and sexual differentiation of the nervous system. *Neuroendocr.*, 6: 168-174.

LANG, R. E., Heil, J. W. E., Ganten, D., Hermann, K., Unger, T., Rascher, W. 1983. Oxytocin Unlike Vasopressin Is a Stress Hormone in the Rat. *Neuroendocr.*, 37: 314-316.

LEDOUX, J. E. 1995. Emotion: clues from the brain. *Annu. Rev. Psychol.*, 46: 209– 235.

LE MEVEL, J.C., Abitol, S., Beraud, G., Maniey, J. 1979. Temporal changes in plasma adrenocorticotropin concentration after repeated neurotropic stress in male and female rats. *Endocrinol.*, 105: 812–817.

LEONARD, B.E. 2001. Stress, norepinephrine and depression. *J. Psych. Neurosci.*, 26: S11–S16.

LEVINE, S. 2000. Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur. J. Pharm.*, 405: 149-160.

LEVINE, S. 2001. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiol. Behav.*, 73: 255-260.

LIBERZON, I., Young, E. A. 1997. Effects of stress and glucocorticoids on CNS oxytocin receptor binding. *Psychoneuroendocr.*, 22: 411-422.

LIM, M. M., Young, L. J. 2006. Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. *Horm. Behav.*, 50: 506-517.

LIPOSITS, Z. S., Phelix, C., Paull, W. K. 1986. Electron microscopic analysis of tyrosine hydroxylase, dopamine- $\beta$ -hydroxylase and phenylethanoamine-N-methyltransferase immunoreactive innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Histochem.* 84: 105-120.

LIPOSITS, Z. S., Phelix, C., Paull, W. K. 1987. Synaptic interaction of serotonergic axons and corticotrophin releasing factor (CRF) synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Histochem.*, 86: 541-549.

LIU, D., Diorio, J., Day, J. C., Francis, D. D., Meaney, M. J. 2000. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat. Neurosci.*, 3: 799–806.

LIU, D., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D. D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M., Meaney, M. J. 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277: 1659-1662.

LOIZOU, L. A. 1972. The postnatal ontogeny of monoamine-containing neurones in the central nervous system of the albino rat. *Brain Res.*, 40: 395-418.

LOOKINGLAND, K. J., Jarry, H. D., Moore, K. E. 1987. The metabolism of dopamine in the median eminence reflects the activity of tuberoinfundibular neurons. *Brain Res.*, 419: 303-310.

LOOKINGLAND, K. J., Gunnel, J. W., Toney, T. W., Moore, K. E. 1990. Comparison of the Effects of Ether and Restraint Stress on the Activity of Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons in Female and Male Rats. *Neuroendocrinol.*, 52: 99-105.

LORENS, S.A., Hata, N., Handa, R.J., Van De Kar, L.D., Guschwan, M., Goral, J., Lee, J.M., Hamilton, M.E., Bethea, C.L., Clancy, J. 1990. Neurochemical, endocrine and



immunological responses to stress in young and old Fischer 344 male rats. *Neurobiol. Aging*. 11:139–150.

LOY, R., MOORE, R. Y. 1979. Ontogeny of the Noradrenergic Innervation of the Rat Hippocampal Formation. *Anat. Embriol.*, 157: 243-253.

LUINE, V.N., Beck, K.D., Bowman, R.E., Frankfurt, M., MacLusky, N.J. 2007. Chronic Stress and Neural Function: Accounting for Sex and Age. *J. Neuroendocr.*, 19: 743-751.

LUNGA, P., Herbert, J. 2004. 17Beta-oestradiol modulates glucocorticoid, neural and behavioural adaptations to repeated restraint stress in female rats. *J Neuroendocrinol*. 16: 776–85.

MÄNNISTÖ, P. T. 1983. Central regulation of thyrotropin secretion in rats: methodological aspects, problems and some progress. *Med. Biol.*, 61: 92-100.

McCORMICK, C. M., Kehoe, P., Mallinson, K., Cecchi, L., Frye, C. A. 2002. Neonatal isolation alters stress hormone and mesolimbic dopamine release in juvenile rats. *Pharm. Biochem. Behav.*, 73: 77-85.

McEWEN, B.S. 2002. Sex, stress and the hippocampus allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging*. 23, p. 921-939.

McEWEN, B. S., Brinton, R., Harrelson, A., Rostene, W. 1987. Modulatory interactions between steroid hormones, neurotransmitters and neuropeptides in hippocampus. *Adv. Biothem. Psychopharmac.* 43: 87-102.

McEWEN, B. S., Gould, E. A., Sakai, R. R. 1992. The vulnerability of the hippocampus to protective and destructive effects of glucocorticoids in relation to stress. *Br. J. Psychiatry* 160 (Suppl.15): 18-24.

MEANEY, M. J. 2001. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci.* 24, p.1161-1192.

MEANEY, M. J., Aitken, D. H., Bhatnagar, S., Van Berckel, C. H., Sapolsky, R. M. 1988. Postnatal handling attenuates neuroendocrine, anatomical, and cognitive impairments related to the aged hippocampus. *Science*, 238: 766-768.

MEANEY, M. J, Diorio, J., Francis, D, Weaver, S., Yau, J., Chapman, K., Seckl, J. R. 2000. Postnatal handling increases the expression of cAMP-inducible transcription factors in the rat hippocampus: the effects of thyroid hormones and serotonin. *J. Neurosci.*, 20: 3926- 3935.

MEANEY, M. J., Diorio, J., Francis, D., Widdowson, J., LaPlante, P., Caldji, C., Sharma, S., Seckl, J.R., Plotsky, P.M. 1996. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev. Neurosci.* 18, 49– 72.

MEANEY, M. J., Sapolsky, R. M., McEwen, B. S. 1985. The development of the Glucocorticoid Receptor System in the Rat Limbic Brain. I. Ontogeny and Autoregulation. *Dev. Brain Res.*, 18: 159-164.

MEIJER, O. C., Dekloet, E. R. 1998. Corticosterone and serotonergic neurotransmission in the hippocampus: functional implications of central corticosteroid receptor diversity. *Crit. Rev Neurobiol.* 12, pp. 1-20.

MEIJER, O. C., KorteKaas, R., Oitzl, M. S., De Kloet, F. R. 1998. Acute rise in corticosterone facilitates 5-HT 1<sup>a</sup> receptor mediated behavioral responses. *Eur. J. Pharm.* 351, pp. 7-14.

MENARD, J. L., Hakvoort, R. M. 2007. Variations of maternal care alter offspring levels of behavioural defensiveness in adulthood: Evidence for a threshold model. *Behav Brain Res.*, 176: 302-313.

MENDELSON, S. D., McEwen, B. S. 1991. Autoradiographic analyses of the effects of restraint-induced stress on 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1C</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the dorsal hippocampus of male and female rats. *Neuroendocr.*, 54: 454–61.

MILLER, D. B., O’Callaghan J. P. 2002. Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism.*, 51: 5-10.

MILLER, W. J. S., Suzuki, S., Miller, L. K., Handa, R., Uht, R. M. 2004. Estrogen receptor (ER)  $\beta$  isoforms rather than ER $\alpha$  regulate corticotropin-releasing hormone promoter activity through an alternate pathway. *J Neurosci.* 24: 10628–10635.

MIRANDA-PAIVA, C. M., Ribeiro-Barbosa, E. R., Canteras, N. S., Felício, L. F. 2003. A role for the periaqueductal grey in opioidergic inhibition of maternal behaviour. *Eur. J. Neurosc.*, 18: 667-674.

MITCHELL, J. B., Rowe, W, Boksa, P, Meaney, M. J. 1990. Serotonin regulates type II corticosteroid receptor binding in hippocampal cell cultures. *J. Neurosc.*, 10: 1745-1752.

MOLES, A., Kieffer, B. L., D’Amato, F. R. 2004. Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Science*, 304: 1983-1986.

MOORE, C. L., Chadwick-Dias, A. M. 1986. Behavioral responses of infant rats to maternal licking: Variations with age and sex. *Dev. Psychobiol.*, 19: 427-438.

MOORE, C. L., Morelli, G. 1979. Mother Rats Interact Differently with Male and Female Offspring. *J. Comp. Physiol. Psychobiol.*, 93: 677-684.

MOORE, C. L., Wong, L. Daum, M. C., Leclair, O.U. 1997. Mother-infant Interactions in Two Strains of Rats: Implications for Dissociating Mechanism and Function of a Maternal Pattern. *Dev. Psychobiol.*, 30: 301-312.

MOORE, K. E., Demarest, K. T., Lookingland, K. J. 1987. Stress, prolactin and hypothalamic dopaminergic neurons. *Neuropharmacol.*, 26: 801-808.

MOORE, R. Y., Bloom, F. E. 1979. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Ann. Rev. Neurosci.*, 2: 113-168.

MORA, P. O., Netto, C. F., Graeff, F. G. 1997. Role of 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor subtypes in the two types of fear generated by the elevated T-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 58: 1051–1057

MORICEAU, S., Sullivan, R. M. 2005. Neurobiology of Infant Attachment. *Dev Psychobiol.*, 47: 230-242.

MORILAK, D. A., Fornal, C. A., Jacobs, B. L. 1987. Effects of physiological manipulations on locus coeruleus neuronal activity in freely moving cats: III. Glucoregulatory challenge. *Brain Res.*, 422: 32– 39.

MOURA, E. G., Moura, C. C. 2004. Regulation of thyrotropin synthesis and secretion. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 48: 40-52

NAKAGAWA, R., Masatoshi, T., Kohno, Y., Ida, Y., Imori, K., Nagasaki, N. 1983. Glucocorticoid attenuate increases in rat brain noradrenaline turnover induced by intense stress. *Kurume Med. J.*, 30: 45-50.

NALAI, Y., Shioda, S., Chiai, H., Kozasa, K. 1986. Catecholamine-peptide interactions in the hypothalamus. In D. Ganten & D. Pfaff, *Morphology of Hypothalamus and Its Connections, Current Topics in Neuroendocrinology*, Springer, Berlin, pp. 135-160.

NELSON, E. E., Panksepp, J. 1998. Brain Substrates of Infant-Mother Attachment: Contributions of Opioids, Oxytocin, and Norepinephrine. *Neurosc. Biobehav. Rev.*, 22: 437-458.

NELSON, J. C., Charney, D. S. 1981. The symptoms of major depressive illness. *Am. J. Psych.*, 138: 1-13.

NESTLER, E. J. 1992. Molecular mechanisms of drug addiction. *J. Neurosci.*, 12: 2439–2450.

NESTLER, E. J., Carlezon, W. A. Jr. 2006. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psych.*, 59: 1151-1159.

NEUMANN, I. D., Wigger, A., torner, L., Holsboer, F., Ladgraf, R. 2000. Brain Oxytocin Inhibits Basal and Stress-Induced Activity of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis In Male and Female Rats: Partial Action Within the Paraventricular Nucleus. *J Neuroendocr.*, 12: 235-243.

NISEMBAUM, L. K., Abercrombie, E. D. 1992. Enhanced tyrosine hydroxylation in hippocampus of chronically stressed rats upon exposure to a novel stressor. *J. Neurochem.*, 58: 276-281.

NISEMBAUM, L. K., Abercrombie, E. D. 1993. Presynaptic alterations associated with enhancement of evoked release and synthesis of norepinephrine in hippocampus of chronically cold-stressed rats. *Brain Res.*, 608: 280-287.

NISEMBAUM, L. K., Zigmond, J., Sved, A. F., Abercrombie, E. D. 1991. Prior exposure to chronic stress results in enhanced synthesis and release of hippocampal norepinephrine in response to a novel stressor. *J. Neurosci.*, 11: 1478-1484.

NOMURA, Y., Naitoh, F., Segawa, T. 1976. Regional changes in monoamine content and uptake of the rat brain during postnatal development. *Brain Res.*, 101: 305-315.

O'BRIEN, J. T. 1997. The 'glucocorticoid cascade' hypothesis in man. *British Journal of Psychiatry.*, 170:199-201.

O'CONNOR, T. M., O'Halloran, D. J., Shanahana, F. 2000. The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *Q. J. Med.*, 93: 323-333.

PADOIN, M. J., Cadore, L. P., Gomes, C. M., Barros, H. M. T., Lucion, A. B. 2001. Long-Lasting Effects of Neonatal Stimulation on the Behavior of Rats. *Behav Neurosci.*, 115: 1332-1340.

PACAK, K., Armando, I., Fukuhara, K., Kvetnansky, R., Palkovits, P., Kopin, I. J., Goldstein, D.S. 1992. Noradrenergic activation in the paraventricular nucleus during acute and chronic immobilization stress in rats: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 589: 91-96.



PACAK, K., Palkovits, M., Kvetnansky, R., Matern, P., Hart, C., Kopin, I. J., Goldstein, D. S. 1995a. Catecholaminergic Inhibition by Hypercortisolemia in the Paraventricular Nucleus of Conscious Rats. *Endocrinol.*, 136: 4817-4819.

PACAK, K., Palkovits, M., Kvetnansky, R., Yadid, G., Kopin, I. J., Goldstein, D. S. 1995b. Effects of Various Stressors on *In Vivo* Norepinephrine Release in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus and on the Pituitary-Adrenocortical Axis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 771: 115-130.

PACAK, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvetnansky, R., Kopin, I. J., Goldstein, D. S. 1998. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am. J. Physiol.*, 275: R1247-R1255.

PACAK, K., Tjurmina, O., Palkovits, P., Goldstein, D. S., Koch, C. A., Hoff, T., Chrousos, G. P. 2002. Chronic Hypercortisolemia Inhibits Dopamine Synthesis and Turnover in the Nucleus accumbens: An *in vivo* Microdialysis Study. *Neuroendocrinol.*, 76: 148-157.

PALKOVITS, M. 1999. Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998. *Front. Neuroendocrinol.* 20, 270–295.

PALKOVITS, M., Baffi, J. S., Pacak, K. 1999. The role of ascending neuronal pathways in stress-induced release of noradrenaline in the hypothalamic paraventricular nucleus of rats. *J. Neuroendocrinol.* 11, 529– 539.

PAPAIOANNOU, A., Dafni, U., Alikaridis, F., Bolaris, S., Stylianopoulou, F. 2002. Effects of neonatal handling on basal and stress-induced monoamine levels in the male and female rat brain. *Neuroscience*, 114: 195-206.

PARIS, J. M., Lorens, S. A., Van De Kar, L. D., Urban, J. H., Richardson- Morton, D. D., Bethea, C. L. 1987. A comparison of acute stress paradigms: Hormonal responses and hypothalamic serotonin. *Physiol. Behav.* 39:33–43.

PATCHEV, V. K., Hayashi, S., Orikasa, C., Almeida, O. F. 1995. Implications of estrogen-dependent brain organization for gender differences in hypothalamo-pituitary-adrenal regulation. *FASEB J* 9: 419–423.

PATCHEV, V. K., Schlosser, S. F., Hassa, A. H. S., Almeida, O. F. X. 1993. Oxytocin binding sites in rat limbic and hypothalamic structures: site-specific modulation by adrenal and gonadal steroids. *Neurosc.*, 57: 537-543.

PEDERSEN, A., Boccia, M.L. 2002. Oxytocin Links Mothering Received, Mothering Bestowed and Adult Stress Responses. *Stress*. v.5, 4, pp. 259-267.

PETERS, D. A. 1982. Prenatal stress: effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone levels. *Pharmacol. Biochem. Behav.*,17: 721-725.

PETERS, S. L., Gray, J. A., Joseph, M. H. 1991. Pre-weaning no-handling of rats disrupts latent inhibition in males, and results in persistent sex- and area-dependent increases in dopamine and serotonin turnover. *Behav. Pharm.*, 2: 215-223.

PETROV, T., Krukoff, T. L., Jhamandas, J. H. 1994. Chemically defined collateral projections from the pons to the central nucleus of the amygdala and hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Cell Tissue Res.* 277, 289– 295.

PEZZONE, M. A., Lee, W. S., Hoffman, G. E., Rabin, B. S. 1992. Induction of c-fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. *Brain Res.* 597, 41– 50.

PHILLIPS, L. J., McGorry, P. D., Garner, B., Thompson, K. N., Pantelis, C., Wood, S. J., Berger, G. 2006. Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for the development of psychotic disorders. *Aust N Z J Psychiatry.* 40(9):725-41. Review.

PHILLIPS, N. K., Hammen, C. L., Brennan, P. A., Najman, J. M., Bor, W., 2005. Early adversity and the prospective prediction of depressive and anxiety disorders in adolescents. *J. Abnorm. Child Psychol.*, 33: 13–24.

PIAZZA, P. V., Rougé-Pont, F., Deroche, V., Maccari, S., Simon, H., Le Moal, M. 1996. Glicocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, pp. 8716-8720.

PLOTSKY, P. M. 1987. Facilitation of immunoreactive corticotrophin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation after activation of catecholaminergic pathways or central norepinephrine injection. *Endocrinol.* 121, pp. 924-930.

POL, O., Campmany, L., Gil, M., Armario, A. 1992. Behavioral and neurochemical changes in response to acute stressors: influence of previous chronic exposure to immobilization. *Pharmac. Biochem. Behav.* 42: 407-412.

PORCHER, W., Heller, A. 1972. Regional development of catecholamine biosynthesis in rat brain. *J. Neurochem.*, 19: 1917-1930.

PREIL, J., Muller, M. B., Gesing, A., Reul, J. M., Sillaber, I., van Gaalen, M. M., Landgrebe, J., Holsboer, F., Stenzel-Poore, M., Wurst, W. 2001. Regulation of the hypothalamic – pituitary – adrenocortical system in mice deficient for CRH receptors 1 and 2. *Endocrinology* 142, 4946– 4955.

PRICE, M. L., Curtis, A. L., Kirby, L. G., Valentino, R. J., Lucki, I. 1998. Effects of Corticotropin-Releasing Factor on Brain Serotonergic Activity. *Neuropsychopharm.*, 18: 492-502.

READ, J., van Os, J., Morrison, A. P., Ross, C. A., 2005. Childhood trauma, psychosis and schizophrenia: a literature review with theoretical and clinical implications. *Acta Psychiatr. Scand.*, 112: 330–350.

REINER, P. B. 1986. Correlational analysis of central noradrenergic neuronal activity and sympathetic tone in behaving cats. *Brain Res.* 378: 86-96

REUL, J. M. H. M., Sutanto, W., Van Eekelen, J. A. M., Rothuizen, J., De Kloet, E. R. 1990. Central action of adrenal steroids during stress and adaptation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 274, 243– 256.

ROMERO, L. M., Plotsky, P. M., Sapolsky, R. M. 1993. Patterns fo adrenocorticotropin secretagog release with hypoglycemia, novelty, and restraint after colchicine blockade of axonal transport. *Endocrinol.*, 132: 199-204.

ROTS, N. Y., de Jong, J., Workel, J. O., Levine, S., Cools, A. R., deKlot, E. R. 1996. Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. *J. Neuroendocrinol.*, 8: 501-506.

RUIT, K. G., Neafsey, E. J. 1988. Cardiovascular and respiratory responses to electrical and chemical stimulation of the hippocampus in anesthetized and awake rats. *Brain Res.* 457: 310-321.

RUIT, K.G., Neafsey, E.J. 1990. Hippocampal input to a “visceral motor” corticobulbar pathway: an anatomical and electrophysiological study in the rat. *Exp. Brain. Res.* 82: 606-616.

RUTTER, M., Kim-Cohen, J., Maughan, B., 2006. Continuities and discontinuities in psychopathology between childhood and adult life. *J. Child Psychol. Psych.*, 47: 276–295.

SALKY, M., Koch, B. 1981. Ontogenesis of glucocorticoid receptors in anterior pituitary gland: transient dissociation among cytoplasmic receptor density, nuclear uptake, and regulation of corticotropic activity. *Endocrinol.*, 108: 591.

SAPOLSKY, R. M. 2000a. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Archives of General Psychiatry.* 57:925–935.

SAPOLSKY, R. M. 2000b. Stress hormones: good and bad. *Neurobiol. Dis.* 7, 540–542.

SAPOLSKY, R. M., Meaney, MJ. 1986. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res.*, 396: 64-76

SAPOLSKY, R. M., Romero, L.M., Munck, A.U. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive suppressive stimulatory and preparative actions. *Endocrine Reviews*. 21:55–89.

SEALE, J. V., Wood, S .A., Atkinson, H. C., Bate, E., Lightman, S .L., Ingram, C. D. et al 2004. Gonadectomy reverses the sexually diergic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity in male and female rats. *J Neuroendocrinology*. 16: 516–524.

SELYE, H. 1936. A Syndrome produced by diverse nocious agents. *Nature*, 138: 32.

SELYE, H. 1976. *Stress in Health and Disease* Butterworth, London.

SEVERINO, G. S., Fossati, I. A. M., Padoin, M. J., Gomes, C. M., Trevizan. L., Sanvitto, G. L., Franci, C. R., Anselmo-Franci, J. A., Lucion, A. B. 2004. 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. *Phyiol. Behav.*, 81: 489-498.

SFIKAKIS, A., Papadopoulou-Daifotis, Z., Sfikaki, M., Messari, J. 1998. Monoaminergic dysregulationon diestrus-2 and estrus through high emotional reactivity. *Pharm. Bioch. Behav.* 60, pp. 285-291.

SHANKS, N., Zalcman, S., Zacharko, R.M., Anisman, H. 1991. Alterations in central norepinephrine, dopamine and serotonin in several strains of mice following acute stressor exposure. *Pharmacol. Biochem. Behav.*

SHINTANI, F., Nakaki, T., Kanba, S., Sato, K., Yagi, G., Shiozawa, M., Asio, S., Kato, R., Asai, M. 1995. Involvement of interleukin-1 in immobilization stress-induced increase in plasma adrenocorticotrophic hormone and in release of hypothalamic monoamines in the rat. *J. Neurosci.*

SHOJI, H., Kato, K. 2006. Maternal behavior of primiparous females in inbred strains of mice: a detailed descriptive analysis. *Physiol. Behav.*, 89: 320–328.

SILVEIRA, P. P., Portela, A. K., Goldani, M. Z., Barbieri, M. A. 2007. Developmental origins of health and disease (DOHaD). *J. Pediatr.*, 83: 494-504.

SMYTHE, J. W., Rowe, W. B., Meaney, M. J. 1994. Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT<sub>2</sub> receptor binding in selected brain regions: relationship to the handling effect on glucocorticoid receptor expression. *Dev. Brain Res.*, 80:183-189.

STRATAKIS, C.A., Chrousos, G.P. 1995. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 771: 1– 18.



SUCHECKI, D., Nelson, D. Y., Van Oers, H., Levine, S. 1995. Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocr.*, 20: 169-182.

SULLIVAN, R. M., Dufresne, M. M. 2006. Mesocortical dopamine and HPA axis regulation: Role of laterality and early environment. *Brain Res.*, 1076: 49-59.

SZYF, M., Weaver, I. C. G., Champagne, F. A., Diorio, J., Meaney, M. J. 2005. Maternal programming of steroid receptor expression and phenotype through DNA methylation in the rat. *Front Neurosci.*, 26: 139-162.

SWANSON, L. W., Kohler, C., Bjorklund, A. 1987. The limbic region. I: the septo hippocampal system. In Bjorklund A., Hokfelt A.T., Swanson L.W.: *Integrated Systems of the CNS, Handbook of Chemical Neuroanatomy*, vol.5, Part 1. : 1-124.

TANAKA, M., Yoshishige, I., Tsuda, A., Shusaku, T., Ishou, S., Masanobi, O. 1989. Metenkephalin, injected during the early phase of stress, attenuates stress-induced increases in noradrenaline release in rat brain regions. *Pharmac. Biochem. Behav.*, 32: 791-795.

TARAZI, F. I., Tomasini, E. C., Baldessarini, R. J. 1999. Postnatal Development of Dopamine D1-Like Receptors in Rat Cortical and Striatolimbic Brain Regions: Na Autoradiographic Study. *Dev. Neurosci.*, 21: 43-49.

THIERRY, A. N., Javoy, F., Glowinski, J., Kety, S. S. 1968. Effects of stress on the metabolism of norepinephrine, dopamine and serotonin in the central nervous system of the rat I: Modifications of norepinephrine turnover. *The J. Pharm. Exp. Therap.*, 163: 163-171.

THOMPSON, T. L., Moss, R. L. 1997. Modulation of mesolimbic dopaminergic activity over the rat estrous cycle. *Neurosc. Lett.* 229, pp.: 145-148.

TILBROOK, A. J., Clarke, I. J. 2006. Neuroendocrine mechanisms of innate states of attenuated responsiveness of the hypothalamo-pituitary adrenal axis to stress. *Front. Neuroendocrinol.*, 27: 285-307.

TRITOS, N., Kitraki, E., Philippidis, H., Stylianopoulou, F. 1999. Neurotransmitter Modulation of Glucocorticoid Receptor mRNA Levels in the Rat Hippocampus. *Neuroendocr.*, 69: 324-330.

TSIGOS, C., Chrousos, G. P. 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.*, 53: 865-871.

UHL-BRONNER, S., Waltisperger, E., Martínez-Lorenzana, G., Lara, M. C., Freund-Mercier, M. J. 2005. Sexually dimorphic expression of oxytocin binding sites in forebrain and spinal cord of the rat. *Neurosc.*, 135: 147-154.

URIARTE, N., Breigeiron, M. K., Benetti, F., Rosa, X. F., Lucion, A. B. 2007. Effects of Maternal Care on the Development, Emotinality, and Reproductive Functions in Male and Female Rats. *Develop. Psychobiol.*, 49: 451-462

VALENTINO, R. J., Van Bockstaele, E. J. 2005. Functional interactions between stress neuromediators and the locus coeruleus-norepinephrine system. In: Steckler, T., Kalin, N. H., Reul, J. M. H. M.: *Handbook of Stress and the Brain*. Elsevier, Amsterdam: 465–486.

VAMVAKOPOULOS, N. C., Chrousos, G. P. 1993. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression. Potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction. *J Clin Invest.*, 92: 1896–1902.

VAN DE KAR, L. D. 1991. Neuroendocrine pharmacology of serotonergic (5-HT) neurons. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 31: 289-320.

VAN DE KAR, L. D., Blair, M. L. 1999. Forebrain pathways mediating stressinduced hormone secretion. *Front. Neuroendocrinol.*, 20: 1 – 48.

VAN OERS, H. J. J., De Kloet, E. R., Li, C., Levine, S. 1998. The Ontogeny of Glucocorticoid Negative Feedback: Influence of Maternal Deprivation. *Endocr.*, 130: 2838-2846.

VÁZQUEZ, D. M. 1998. Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocr.*, 23: 663-700.

VÁZQUEZ, D. M., Eskandari, R., Zimmer, C. A., Levine, S., López, J. F. 2002. Brain 5-HT receptor system in the stressed infant rat: implications for vulnerability to substance abuse. *Psychoneuroendocr.*, 27: 245-272.

VECSERNYÉS, M., Török, A., Jójárt, I., Laczi, F., Penke, B., Julesz, J. 1994. Specific radioimmunoassay of oxytocin in rat plasma. *Endocr. Regul.*, 28: 145-150.

VERMETTEN, E., Bremner, J.D. 2002. Circuits and systems in stress. I. Preclinical studies. *Depress Anxiety.*, 15: 126–147.

VERNEY, C., Baulac, M., Berger, B., Alvarez, C., Vigny, A., Helle, K. B. 1985. Morphological evidence for a dopaminergic terminal field in the hippocampal formation of young and adult rat. *Neurosci.*, 14: 1034-1052.

VIAU, V., Meaney, M. J. 1991. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinol.*, 129: 2503–11.

WALKER, C. D., Deschamps, S., Proulx, K., Tu, M., Salzman, C., Woodside, B., Lupien, S., Gallo-Payet, N., Richard, D. 2004. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal

regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. *Rev Psychiatr Neurosci.*, 29: 364-382.

WALKER, C. D., Kudreikis, K., Sherrard, A., Johnston, C.C. 2003. Repeated neonatal pain influences maternal behavior, but not stress responsiveness in rat offspring. *Develop Brain Res.*, 140: 253-261.

WALKER, C. D., Perrin, M., Vale, W., Rivier, C. 1986. Ontogeny of the Stress Response in the Rat: Role of the Pituitary and the Hypothalamus. *Endocrinol.*, 118: 1445-1451.

WALKER, C. D., Scribner, K. A., Cascio, C. S., Dallman, M.F. 1991. The Pituitary-Adrenocortical System of Neonatal Rats Is Responsive to Stress throughout Development in a Time-Dependent and Stressor-Specific Fashion. *Endocrinol.*, 128: 1385-1395.

WEAVER, I. C. G., Grant, R. J., Meaney, M.J. 2002. Maternal behavior regulates long-term hippocampal expression of BAX and apoptosis in the offspring. *J. Neurochem.*, 82: 998–1002.

WEAVER, I. C. G., La Plante, P., Weaver, S., Parent, A., Sharma, S., Diorio, J., Chapman, K. E., Seckl, J. R., Szyf, M., Meaney, M. J. 2001. Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites. *Mol Cell endocr.*, 185: 205-218.

WEINER, R. I., Ganong, W. 1978. Role of Brain Monoamines and Histamine in Regulation of Anterior Pituitary Secretion. *Physiol. Rev.*, 58: 905-975.

WILKINS, A. S., Logan, M., Kehoe, P. 1997. Postnatal Pup Brain Dopamine Depletion Inhibits Maternal Behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 58: 867-873.

YAU, J. L., Noble, J., Seckl, J. R. 1997a. Site-specific regulation of corticosteroid and serotonin receptor subtype gene expression in the rat hippocampus following methylenedioxymethamphetamine: role of corticosterone and serotonin. *Neurosci.*, 78: 111-121.

YAU, J. L., Noble, J., Widdowson, J., Seckl, J. R. 1997b. Impact of adrenalectomy on 5-HT<sub>6</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptor gene expression in the rat hippocampus. *Mol Brain Res.*, 45: 182-186.

YI, S. J., Baram, T. Z. 1994. Corticotropin-Releasing Hormone Mediates the Response to Cold Stress in the Neonatal Rat without Compensatory Enhancement of the Peptide's Gene Expression. *Endocr.*, 135: 2364-2368.

YOKOYAMA, C., Okamura, H., Nakajima, T., Taguchi, J., Ibata, Y. 1994. Autoradiographic distribution of [3H]YM-09151-2, a high-affinity and selective antagonist ligand for the dopamine D2 receptor group, in the rat brain and spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 344: 121-136.

YOUNG, E. A. 1998. Sex differences and the HPA axis: implications for psychiatric disease. *J Gend Specif Med.*, 1: 21–7.

YOUNG, L. J., Muns S., Wang, Z., Insel, T. R. 1997a. Changes in oxytocin receptor mRNA in rat brain during pregnancy and the effects of estrogen and interleukin-6. *J. Neuroendocr.*, 9: 859-865.

YOUNG, L. J., Winslow, J. T., Wang, Z., Gingrich, B., Guo, Q., Matzuk, M. M., Insel, T. R. 1997b. Gene targeting approaches to neuroendocrinology: oxytocin, maternal behavior, and affiliation. *Horm. Behav.*, 31: 221-231.

YOUNG, S. N., Pihl, R. O., Benkelfat, C., Palmour, R., Ellenbogen, M., Le-Marquand, D. 1996. The effect of low brain serotonin on mood and aggression in humans—influence of baseline mood and genetic factors. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 398: 45–50.

ZAR, J. H. 1996. *Biostatistical Analysis*, 3.ed. New Jersey: Prentice Hall Upper Saddle River.

ZHANG, T. Y., Bagot, R., Parent, C., Nesbitt, C., Bredy, T. W., Caldji, C., Fish, E., Anisman, H., Szyf, M., Meaney, M. J. 2006. Maternal programming of defensive responses through sustained effects on gene expression. *Biol. Psych.*, 73: 72-89.

ZHANG, T. Y., Chretien, P., Meaney, M. J., Gratton, A. 2005. Influence of naturally occurring variations in maternal care on prepulse inhibition of acoustic startle and the medial prefrontal cortical dopamine response to stress in adult rats. *J. Neurosci.*, 25: 1493–1502.

ZHANG, T. Y., Perent, C., Weaver, I., Meaney, M. J. 2004. Maternal Programming of Individual Differences in Defensive Responses in the Rat. *Ann. N. Y. Sci.* 1032: 85-103.

ZHANG, X., Kindel, G. H., Wülfert, E., Hanin, I. 1995. Effects of Immobilization Stress on Hippocampal Monoamine Release: Modifications by Mivazerol, a New  $\alpha_2$ -Adrenoceptor agonist. *Neuropharm.*, 34: 1661-1672.



*8. Anexo*

---

## 8.1 Planilha de Registro de Comportamento Materno

**RATA:** \_\_\_\_\_ **HG** - High crouch (amamentando c/ dorso bem arqueado) **CN** - Construção do ninho  
**Data do parto:** \_\_\_\_\_ **LW** - Low crouch (amamentando c/ dorso pouco arqueado) **OFF** - Mãe fora do ninho/caixa  
**Grupo:** \_\_\_\_\_ **SUP** - Supine post. (amamentando de lado ou de costas) **R** - Recolhida de filhotes  
**Ninho:** \_\_\_\_\_ **L** - Lambendo filhotes **FFN** - Filhotes fora do ninho  
**DATA:** \_\_\_\_\_ **DIAS PP:** \_\_\_\_\_ **HG/L** - Amamentando com o dorso bem arqueado e lambendo **MN** - No ninho sem posição de amamentação

	DATA: _____ DIAS PP: _____																								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1:00	1:03	1:06	1:09	1:12
CLARO 1																									
CLARO 2																									
CLARO 3																									
ESCURO 1																									

HG
LW
SUP
L
CN
OFF
R
FFN
HG/L
MN

	DATA: _____ DIAS PP: _____																								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1:00	1:03	1:06	1:09	1:12
CLARO 1																									
CLARO 2																									
CLARO 3																									
ESCURO 1																									

HG
LW
SUP
L
CN
OFF
R
FFN
HG/L
MN