

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

ESTIMULAÇÃO NEONATAL, COMPORTAMENTOS E DESENVOLVIMENTO DO
SISTEMA NERVOSO NO RATO WISTAR.

Maristela Jorge Padoin

Orientador

Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

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

Porto Alegre

2000

Aqui, inicia uma nova fase

Á Deus, que me deu raras preciosidades,
Lorenzo, Breno, Anacleto, Arlinda, Ailson, Auristela e Marcelo.

AGRADECIMENTOS

A Aldo Bolten Lucion, pela amizade, paciência, amor, incentivo, companheirismo, e **depois** disso pela orientação. Obrigado Chefe.

A minha família Breno e Lorenzo, pelo amor que suportaram as horas de meu afastamento.

Aos meus Pais, Arlinda e Anacleto, e meus irmãos, Ailson, Auristela e Marcelo por sempre me fazerem acreditar que eu era muito mais do que pensava.

As colegas de Laboratório, Márcia Giovenardi, Angélica Consiglio, Rosa Martins de Almeida, Gabriela Pereira, Gabriela Severino, Márcia Koja por me fazerem ter alegria em trabalhar.

A todas outras pessoas do laboratório que me auxiliaram e foram além de colegas, amigos, em especial a Luciana Paula Cadore, pelo auxílio nos experimentos e companheirismo.

Aos meus sogros que cuidaram do Lorenzo para que esse trabalho pudesse ser concluído.

A todas as pessoas do pós-graduação pelo carinho e atenção.

Ao Dr. Felipe Schneider, pela atenção com que me encaminhou nos experimentos morfológicos.

Ao Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda, pela acolhida em seu laboratório e pelos ensinamentos.

As alunas Francine Martins Pereira, Marly de Jorge e Sissiane Simon Palma pelo carinho e amizade.

Enfim, á todos que eu amo.

-Ah, também ao CNPQ que me sustentou, FAPERGS e FINEP que sustentaram meus experimentos.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Estresse	1
1.2 Período hiporresponsivo ao estresse.....	4
1.3 Estimulação neonatal.....	6
1.4 Estimulação neonatal e glicocorticóides.....	7
1.5 Efeito da estimulação neonatal sobre o comportamento.....	8
1.6 Estresse neonatal e hormônios gonadais.....	14
1.7 Estimulação neonatal e densidade neuronal.....	19
2. OBJETIVO.....	29
CAPÍTULO 1.....	32
1. MATERIAIS E MÉTODOS	33
1.1 Animais.....	32
1.2 Metodologia da estimulação aversiva.....	33
1.3 Registro dos comportamentos.....	34
1.3.1 Campo-aberto com um predador	34
1.3.2 Labirinto em cruz elevado	36
1.3.3 Comportamento agressivo maternal	37

1.3.4	Comportamento sexual masculino.....	39
1.3.5	Habituação no campo-aberto.....	40
1.3.6	Labirinto aquático de Morris	41
1.3.7	Teste de nado-forçado	42
1.4	Análise estatística.....	43
2.	RESULTADOS.....	44
2.1	Campo-aberto com um predador.....	44
2.2	Labirinto em cruz elevado.....	48
2.3	Comportamento agressivo maternal.....	49
2.4	Comportamento sexual de machos.....	53
2.5	Habituação no campo-aberto.....	57
2.6	Labirinto aquático de Morris.....	60
2.7	Teste de nado-forçado.....	61
3.	DISCUSSÃO	62
3.1	Campo-aberto com o predador.....	62
3.2	Labirinto em cruz elevado.....	64
3.3	Comportamento agressivo maternal	66
3.4	Comportamento sexual de machos	67
3.5	Habituação no campo-aberto e labirinto aquático de Morris.....	70
3.6	Nado-forçado	71
3.7	Comparação entre os grupos experimentais	72

CAPÍTULO 2	75
1. MATERIAIS E MÉTODOS	75
1.1 Animais.....	75
1.2 Metodologia da estimulação aversiva.....	76
1.3 Registro dos comportamentos	76
1.3.1 Campo-aberto com um predador.....	76
1.3.2 Labirinto em cruz elevado.....	76
2. RESULTADOS	77
2.1 Campo-aberto com um predador.....	77
2.2 Labirinto em cruz elevado.....	80
3. DISCUSSÃO	83
CAPÍTULO 3	86
1. MATERIAIS E MÉTODOS	86
1.1 Animais.....	86
1.2 Metodologia da manipulação.....	87
1.3 Processo cirúrgico.....	87
1.4 Registro dos comportamentos.....	88
1.4.1 Campo-aberto com um predador.....	88
1.4.2 Labirinto em cruz elevado.....	88
1.5 Análise estatística	89

2. RESULTADOS	89
2.1 Campo-aberto com um predador	89
2.2 Labirinto em cruz elevado	90
3.DISSCUSSÃO.....	93
CAPÍTULO 4	94
1.MATERIAIS E MÉTODOS	94
1.1 Animais.....	94
1.2 Metodologia da estimulação aversiva	95
1.3 Processo cirúrgico	95
1.4 Processo histológico	96
1.5 Metodologia do disector	97
1.6 Análise estatística	100
2.RESULTADOS	100
2.1 Análise da densidade neuronal na porção central da amígdala medial.....	100
2.2 Análise da densidade neuronal no córtex pré- frontal.....	102
3.DISSCUSSÃO	111
CAPÍTULO 5	105
1.MATERIAIS E MÉTODOS	105
1.1 Animais.....	105
1.2 Metodologia da manipulação	106
1.3 Processo cirúrgico	106
1.4 Processo histológico	106

1.5	Imunohistoquímica	107
1.6	Processo de coloração para evidenciar a marcação para apoptose.....	107
1.7	Análise estatística	108
2.	RESULTADOS	109
2.1	Efeito da estimulação neonatal sobre a apoptose.....	109
3.	DISCUSSÃO.....	111
3.	CONCLUSÕES	116
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
ANEXO 1 – Trabalho encaminhado para publicação		

LISTA DE TABELA E FIGURAS

-CAPÍTULO 1

-RESULTADOS

-FIGURA 1:

Efeito da estimulação neonatal sobre a duração dos comportamentos no campo-aberto com o predador em machos e fêmeas na idade adulta.....47

-TABELA 1: Efeito da estimulação aversiva neonatal sobre a frequência e duração de comportamentos no labirinto em cruz elevado em machos e fêmeas adultos (70 dias de idade)..... 49

-TABELA 2: Efeito da estimulação neonatal sobre a duração dos comportamentos analisados no teste de comportamento agressivo maternal.....50

-TABELA 3: Efeito da estimulação neonatal sobre a latência dos comportamentos analisados no teste de comportamento agressivo maternal.....51

-TABELA 4: Efeito da estimulação neonatal sobre as frequências do comportamento agressivo maternal.....51

-FIGURA 2: Efeito da estimulação neonatal sobre o comportamento agressivo maternal de fêmeas.....52

- TABELA 5: Efeito da estimulação neonatal sobre o comportamento sexual de machos aos 70 dias de idade. O comportamento foi analisado em animais com e sem experiência sexual prévia.....55
- FIGURA 3: Efeito da estimulação neonatal sobre o comportamento sexual de machos aos 70 dias de idade. Em cada grupo foi realizado uma análise dos machos sem experiência sexual prévia e com experiência sexual.....56
- TABELA 6: Efeito da estimulação neonatal sobre a frequência do comportamento de habituação no campo-aberto de machos aos 70 dias de idade. Os comportamentos foram analisados durante 4 dias consecutivos.....57
- TABELA 7: Efeito da estimulação neonatal sobre a frequência do comportamento de habituação no campo aberto de fêmeas aos 70 dias de idade. Os comportamentos foram analisados durante 4 dias consecutivos.....58
- FIGURA 4: Efeito da estimulação neonatal sobre o comportamento de habituação no campo-aberto em machos e fêmeas adultos. O teste foi realizado em 4 dias consecutivos (sessões 1, 2, 3 e 4).....59
- TABELA 8: Efeito da estimulação neonatal sobre o comportamento de natação no labirinto aquático de Morris em machos e fêmeas aos 70 dias de idade.....60

-TABELA 9: Efeito da estimulação neonatal sobre a duração dos comportamentos no teste de nado-forçado, em machos e fêmeas aos 70 dias de idade, analisados no dia 1 (teste) e 2 (reteste).....	61
--	----

CAPÍTULO 2

RESULTADOS

-TABELA 10: Efeito da estimulação neonatal sobre os comportamentos no teste de labirinto em cruz elevado em animais na fase peripuberal (33-35 dias de idade).....	81
--	----

-FIGURA 6: Efeito da estimulação neonatal sobre a duração dos comportamentos no campo-aberto com o predador, em machos e fêmeas na fase peripuberal.....	82
--	----

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

-TABELA 11: Efeito da estimulação neonatal sobre a frequência e duração de comportamentos no labirinto em cruz elevado em machos e fêmeas adultos, <u>castrados aos 27 dias de idade</u>	91
--	----

-FIGURA 6: Efeito da estimulação neonatal sobre a duração dos comportamentos no campo-aberto com o predador em animais adultos que foram gonadectomizados aos 27 dias de idade.....	92
---	----

CAPÍTULO 4

MATERIAL E MÉTODOS

-FIGURA 7: Esquema do disector. Dois cortes paralelos e a uma distância conhecida passa pela estrutura.....98

-FIGURA 8: Área da amígdala medial utilizada como parâmetro para contagem neuronal.....99

-FIGURA 9: Área do córtex pré-frontal (Fr 2) utilizada como parâmetro para contagem neuronal.....99

RESULTADOS

-FIGURA 10: Efeito da estimulação neonatal sobre a densidade neuronal na porção central da amígdala medial em animais aos 11, 35 e 70 dias de idade...101

-FIGURA 11: Efeito da estimulação neonatal sobre a densidade neuronal, nas camadas 2 e 3 do córtex pré-frontal 2, em ratos analisados aos 11, 35 e 70 dias de idade.....103

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

-TABELA 12: Efeito da estimulação neonatal sobre a apoptose neuronal na amígdala medial em animais aos 5 dias de idade.....109

-FIGURA 12 A: Marcação por imunohistoquímica para apoptose. Animais intactos, com 5 dias de idade. Objetiva de 40x. Em lilás células não marcadas para apoptose, em marrom células em processos apoptóticos110

-FIGURA 12 B: Marcação por imunohistoquímica para apoptose. Animais manipulados, com 5 dias de idade. Objetiva de 40x. Em lilás células não marcadas para apoptose, em marrom células em processos apoptóticos.....110

ABREVIATURAS

ACTH- hormônio adrenocorticotrófico

Ame- amígdala medial

DNA-ácido desoxirribonucleico

CORT- corticosterona

CRH- hormônio liberador da corticotrofina

EPM- erro padrão da média

FSH- hormônio folículo estimulante

HPA- eixo hipotálamo-hipófise

GH- hormônio do crescimento

LC- lócus coeruleus

LH- hormônio luteinizante

LHRH- hormônio liberador do hormônio luteinizante

NE-Noradrenalina

PCD- morte programada da célula

PRL- prolactina

PVN- núcleo paraventricular do hipotálamo

SNC- sistema nervoso central

TSH- hormônio tireoestimulante

RESUMO

A estimulação no período neonatal é um tema que vem sendo estudado desde 1957 com trabalhos de Denenberg e Levine, principalmente sobre os efeitos desta estimulação sobre o comportamento do animal frente a ambientes novos. Além disso, uma grande quantidade de trabalhos tem investigado o efeito da estimulação neonatal sobre as variações hormonais em várias idades bem como sobre a plasticidade cerebral.

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da estimulação no período neonatal (1-10 dias de idade) sobre os comportamentos de ratos machos e fêmeas Wistar na idade adulta e peripuberal. Foram estudados também os efeitos comportamentais de hormônios gonadais e ainda os efeitos sobre a densidade neuronal na amígdala medial e córtex pré-frontal em animais aos 11, 35 e 70 dias de idade.

Foram realizados 5 experimentos sendo que em cada um deles, os grupos analisados foram divididos em: intactos, manipulados (submetidos a delicada manipulação tátil durante 1 min) e estimulados (submetidos a frio, luz ou som intensos durante 10 min). No capítulo 1, foi analisado o efeito da estimulação neonatal sobre os comportamentos em animais adultos, os testes realizados foram: campo-aberto com o predador (gato), labirinto em cruz elevado, agressividade maternal, comportamento sexual de machos, habituação no campo-aberto, labirinto aquático de Morris e nado-forçado. Os resultados destes experimentos mostraram, de maneira geral, que os animais dos grupos experimentais desenvolveram quando adultos uma hiperatividade, diminuição do

medo, diminuição da atividade sexual em machos e aumento do comportamento agressivo maternal. Por outro lado, os animais dos grupos experimentais não mostraram alterações quanto a habituação, memória e depressão. No capítulo 2, foram analisados os efeitos da estimulação neonatal sobre os comportamentos no campo-aberto com o predador e labirinto em cruz elevado, em animais na fase peripuberal. Ao contrário dos animais adultos, na fase peripuberal os comportamentos dos grupos experimentais não foram afetados pela estimulação neonatal. No capítulo 3, foram analisados os efeitos da estimulação neonatal sobre os comportamentos de campo-aberto com o predador e labirinto em cruz elevado, em animais adultos que foram gonadectomizados aos 27 dias de idade. Os resultados desse experimento mostraram que os animais dos grupos experimentais não mostram diferenças comportamentais quando comparados aos intactos. No capítulo 4, foi analisado o efeito da estimulação neonatal sobre a densidade neuronal na amígdala medial e córtex pré-frontal em animais aos 11, 35 e 70 dias de idade. A densidade neuronal dos grupos experimentais, de maneira geral, diminuiu quando comparados aos intactos. Por fim, no capítulo 5, foi analisado através de imunohistoquímica, o efeito da estimulação neonatal sobre a apoptose neuronal na amígdala medial em animais aos 5 dias de idade. Os resultados mostraram que houve um aumento da apoptose nos grupos experimentais comparados aos intactos, evidenciando que os resultados do experimento 4 foram causados por uma intensificação da apoptose neuronal no período que foi realizado a estimulação. Os itens material e método, resultados e discussão acompanham a divisão dos capítulos.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estresse

Os organismos vivos sobrevivem graças à manutenção de um equilíbrio interno complexo, dinâmico e harmonioso, denominado homeostase, que é constantemente ameaçado por uma variedade de estímulos ambientais. Nestas situações de ameaça ou perigo os organismos desencadeiam uma série de respostas adaptativas, denominadas de sistemas de estresse, que consistem de um repertório de reações na tentativa de manter o equilíbrio interno ou reestabelecer o equilíbrio perdido (Chrousus et al., 1992). Assim as respostas ao estresse servem para manter ou restaurar a homeostasia.

Os principais componentes destas respostas adaptativas são o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o sistema autonômico simpático através da noradrenalina (Chrousus et al., 1992).

Os neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo sintetizam o hormônio corticotrófico (CRH); seus axônios passam pelo hipotálamo médio basal terminando nos vasos porta-hipofisários da eminência média onde o CRH é liberado (Plotsky, 1991). Por esta via, o CRH atua como fator liberador, ativando a hipófise a liberar hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que atua na zona fasciculada do córtex da adrenal estimulando a liberação de glicocorticóides (Valentino & Foote, 1986; Rivier & Plotsky, 1986). No homem, o glicocorticóide de maior importância é o cortisol e no rato, a corticosterona. Além da estimulação do eixo HPA, o estresse causa um aumento significativo na ativação da divisão simpática do sistema nervoso

autonômico que por consequência aumenta a secreção de adrenalina e noradrenalina (NE) pelos terminais simpáticos, responsáveis por respostas compensatórias específicas, bem como pela medular da adrenal, que atua nas respostas mais gerais. Desta forma, estas catecolaminas induzem alterações em inúmeras funções autonômicas que dão o suporte necessário ao organismo para manter a homeostasia.

Além das alterações das funções autonômicas, as catecolaminas, em conjunto com os glicocorticóides da adrenal, servem para mobilizar a produção e distribuição de substratos energéticos durante o estresse (Kopin, 1995). As concentrações de vários hormônios hipofisários podem se alterar em resposta a estímulos estressantes. Por exemplo, exposição a natação forçada, ao éter e ao ruído intenso levam à diminuição das concentrações plasmáticas de hormônio do crescimento (GH), hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) e a um aumento das concentrações de ACTH, prolactina (PRL) e hormônio tireoestimulante (TSH) (Armario et al., 1986). Dos hormônios hipofisários, a secreção de ACTH é a mais utilizada para se determinar se um estímulo é estressante ou não.

O CHR está presente no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), bem como, em regiões extra-hipotalâmicas. Imunorreatividade ao CRH foi detectada no núcleo central e medial da amígdala, estria terminal, núcleo septal lateral, núcleo parabraquial, núcleo dorsal da rafe, córtex cerebral, hipocampo, no córtex cerebelar, no núcleo olivar inferior e Locus Coeruleus (LC) (Bloom et al., 1982; Kawata et al., 1982; Cummings et al., 1983; Swanson & Petrovich., 1998; Merchenthaler et al., 1982; Olschowka et al., 1982; Powers et al., 1987).

A ampla distribuição do CRH no sistema nervoso central (SNC) sugere que este peptídeo atue não só estimulando o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), mas também como um neurotransmissor em circuitarias extra-hipotalâmicas, as quais estão envolvidas nas respostas do organismo a estímulos estressantes.

Existem conexões entre os componentes dos sistemas de estresse de tal forma que a ativação de um pode levar à ativação de outros. Como exemplo destas interações podemos citar os neurônios do PVN, que secretam CRH, e os neurônios do LC, que produzem a noradrenalina (NE), que interagem entre si através de uma alça positiva de retroalimentação (Valentino & Foote., 1986). A administração de CRH no LC aumenta a liberação de NE, de forma dose dependente (Schulz & Lehnert, 1996), por aumentar a frequência de disparo destes neurônios (Valentino & Foote, 1986; Curtis & Valentino, 1991). Outra forma de interação desses sistemas de estresse é a modulação dos centros autonômicos simpáticos pelo CRH (Swanson et al., 1986). Assim, os componentes dos sistemas de estresse podem atuar de forma concomitante, havendo complexa modulação entre eles. Essa modulação é fundamental para a maior efetividade dos sistemas de estresse, tanto na manutenção como no reestabelecimento da homeostase.

1.2. Período hiporresponsivo ao estresse

No rato, o período hiporresponsivo ao estresse (duas primeiras semanas de vida) é marcado por uma redução na capacidade de secretar ACTH e corticosterona em resposta ao estímulo estressor (Walker et al., 1993). Além da manipulação, outros tipos de estímulos estressantes, aplicados aos animais no período de amamentação foram usados, inclusive em nosso laboratório. Alguns desses procedimentos, como por exemplo expor os filhotes ao frio (0° C), que seria considerado um estímulo estressor para um rato adulto, no animal neonatal provoca apenas discreta ou nenhuma alteração dos hormônios clássicos do estresse como o ACTH e a corticosterona (Walker et al., 1986). No rato, durante as primeiras duas semanas após o parto, a glândula adrenal produz níveis muito baixos de hormônios corticosteróides. Os níveis de ACTH produzidos pela hipófise nessa fase são também muito baixos, aumentando paulatinamente até a puberdade (Walker et al., 1986). Por este motivo, durante esse período, chamado de período hiporresponsivo ao estresse, as reações a estímulos ambientais são acompanhadas apenas por discreta elevação dos hormônios da adrenal, diferentemente do que acontece com animais adultos (Gould et al., 1991; Levine, 1994).

O eixo hipotálamo-hipófise somente funciona coordenadamente e apropriadamente quando todas as partes que o compõe se encontram amadurecidas. Amadurecimento não só da capacidade de síntese e secreção dos hormônios, mas também da resposta integrada com os tecidos alvos que articulam a retroalimentação da regulação hormonal. Uma possibilidade é de

que a pituitária neonatal seja incapaz de responder a liberação de CRF pelo hipotálamo via sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, devido a: 1) inabilidade para sintetizar e estocar ACTH, 2) imaturidade do sistema de receptores CRF ou 3) dissociação entre a estimulação dos receptores de CRF e a secreção de ACTH. Estas considerações foram feitas por Walker et al., (1986) demonstrando que ratos injetados com CRF no período neonatal não produzem o aumento dos níveis de ACTH observados na idade adulta.

Comum a todas essas explicações é o fato que, no período neonatal, alguns aspectos do desenvolvimento do animal encontram-se em fase de maturação ou temporariamente inibidos.

Hotta et al. (1988) observaram que a secreção de Beta-endorfinas é dose-dependente da resposta do CRF ao estresse. Estes dados sugerem que a hipófise já na fase neonatal é capaz de sintetizar e secretar ACTH em resposta ao estresse em ratos, levando a conclusão que uma inabilidade do hipotálamo para secretar CRF é um importante componente do período hiporresponsivo ao estresse. No período neonatal, a hipófise é hipersensitiva a retroalimentação negativa devido aos baixos níveis circulantes de corticosterona durante este período (Walker, 1986).

Em ratos, durante o período hiporresponsivo ao estresse (do dia 2 ao dia 14 pós-parto no rato), tanto as estimulações aparentemente "inofensivas" como a manipulação, por exemplo, quanto estímulos estressores como frio e choque elétrico induzem praticamente às mesmas alterações comportamentais e endócrinas na fase adulta (Levine, 1994). Dessa forma, os grupos de pesquisa que trabalham nessa área consideram os estímulos a que os animais são

submetidos no período neonatal apenas como estimulação sensorial, não os caracterizando como estressores, mesmo que assim o sejam considerados num animal adulto (Levine, 1994).

1.3. Estimulação Neonatal

Eventos precoces na vida dos indivíduos, como traumatismos e infecções durante ou logo após o parto, estão correlacionadas a distúrbios comportamentais na vida adulta. A estimulação neonatal tem sido utilizada há algumas décadas como modelo experimental para examinar os mecanismos pelos quais variações precoces do ambiente do animal afetam o desenvolvimento de sistemas neurais, dando origem a alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis na fase adulta (Levine, 1962; Denenberg, 1964).

Em ratos, a estimulação neonatal tipicamente consiste da “manipulação” dos animais por alguns minutos, em geral durante as duas primeiras semanas de vida. Esses animais quando adultos têm uma resposta menos acentuada da secreção de glicocorticóides pela supra-renal, quando expostos a estímulos estressores. Ou seja, ratos manipulados na infância apresentam frente a novos estímulos estressantes, uma secreção de corticosterona menor que animais não manipulados na mesma fase (Levine, 1993; Meaney et al., 1993). Contudo, os níveis basais de corticosterona de animais manipulados e não-manipulados não diferem entre si quando adultos. As diferenças entre eles parecem ser devidas a uma sensibilidade diferencial do SNC ao mecanismo de retroalimentação negativa da supra-renal (Levine, 1994). Foi demonstrado que

ratos adultos manipulados precocemente tem uma maior densidade de receptores glicocorticóides no hipocampo (Meaney et al., 1993; Sapolsky, 1994). Postula-se que essa seria a causa das diferenças nas respostas ao estímulo estressor na vida adulta entre animais estimulados e não estimulados na infância (Meaney et al., 1994; Bhatnagar & Meaney, 1995).

1.4. Estimulação neonatal e glicocorticóides

Animais manipulados diariamente nas 3 primeiras semanas de vida mostram um aumento da concentração de receptores glicocorticóides no hipocampo quando examinados aos 7 meses de idade (Meaney et al., 1985a). Durante os primeiros dias após o nascimento a concentração de receptores glicocorticóides no hipocampo do rato está relativamente baixa, aproximadamente 20% da concentração existente no animal adulto (Clayton et al., 1977; Meaney et al., 1985b; Olpe & McEwen, 1976). A concentração de receptores para glicocorticóides aumenta dramaticamente durante as primeiras duas semanas de vida. Estudos autoradiográficos, examinando o desenvolvimento dos receptores glicocorticóides em regiões específicas dentro do hipocampo, mostravam que em certas áreas, notadamente no giro denteado, a concentração continua oscilando até a segunda semana de vida (Meaney et al., 1985c). Esse dado sugere que algumas modificações estendem-se por mais tempo. Assim, a manipulação é mais efetiva durante o período que a concentração de receptores glicocorticóides está aumentando em direção aos níveis de animais adultos (primeiras duas semanas de vida). O efeito da

manipulação sobre a concentração dos receptores glicocorticóides é específica para o hipocampo, embora menos pronunciada do que no córtex frontal (Meaney et al., 1985a, 1989, 1991).

1.5. Efeito da estimulação neonatal sobre o comportamento

A manipulação neonatal, procedimento aparentemente não estressante ao indivíduo, tem como consequência, na vida adulta, uma série de alterações comportamentais que se caracterizam basicamente por uma diminuição do medo a ambientes novos (Hess et al., 1969; Denenberg et al., 1973; Smythe et al., 1994).

Levine (1957) iniciou os estudos sobre a estimulação neonatal, verificando que animais manipulados neste período eram emocionalmente menos comprometidos quando adultos, quando avaliados através de um teste de aprendizagem de fuga após o choque. Em continuidade, demonstrou que animais manipulados ou estimulados por choque neste período, aumentavam a ingestão de água quando adultos após períodos de privação de 18 hrs (Levine, 1957) e 24hrs (Levine, 1958).

A partir desses trabalhos iniciou-se toda uma discussão em torno do período crítico do desenvolvimento do rato, o que levou a uma intensificação do estudo da estimulação neonatal.

Denenberg & Karas (1960) mostraram que animais manipulados entre o 1^o e 10^o dias neonatal aumentavam o peso corporal, a capacidade de aprendizagem de fuga e da capacidade de sobrevivência, resultados não

observados quando os animais foram manipulados do 11^o ao 20^o dias de vida. Quando a manipulação foi realizada por períodos de 3 ou 5 dias as diferenças acima não foram encontradas (Denenberg, 1962a).

Em outro estudo, Denenberg & Kline (1964) testaram com estimulação por choque elétrico, animais nos períodos do 1^o ao 10^o dia de vida. Os ratos foram divididos em grupos que foram submetidos a estimulação em diferentes dias neonatal: 1-5, 1-3, 3-5 e 2, apenas o grupo que sofreu estimulação somente no dia 2 não mostrou as alterações dos trabalhos acima.

Posteriormente o teste de campo aberto foi amplamente utilizado para análise dos efeitos comportamentais da estimulação neonatal. Verificou-se que os animais que sofreram estimulação neonatal (tanto manipulação quanto estimulação por choque elétrico), mostraram um aumento da locomoção e da atividade exploratória, bem como uma diminuição do medo e ansiedade na fase adulta (Denenberg & Morton, 1962; Denenberg & Smith, 1963 e Denenberg & Whimbey, 1963).

Hunt & Otis (1963) mostraram que os animais manipulados, quando privados de água e comida na idade adulta, tinham uma menor latência para encontrar o alimento no campo aberto. Trabalhos posteriores em nosso laboratório, mostraram que este resultado deve ser devido ao aumento da locomoção e exploração do animal no campo aberto, aumentando a probabilidade do mesmo encontrar o alimento.

A partir de 1967 os estudos sobre os efeitos da estimulação no período neonatal voltaram-se para a relação hormonal, principalmente com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Levine et al. (1967) consideraram que o

comportamento seria um processo adaptativo bem como a produção de glicocorticóides, que sob certas condições fisiológicas ambos fenômenos poderiam gerar efeitos imprevisíveis no organismo.

Existe uma considerável quantidade de trabalhos mostrando que a manipulação, ou qualquer outro tipo de estimulação do animal no período neonatal provoca um distúrbio da relação mãe-filhote. As mães de filhotes manipulados lambem mais sua prole do que mães de filhotes não manipulados. Sabe-se, por outro lado, que o comportamento da mãe em relação ao filhote (lamber o corpo do filhote, por exemplo) afeta o desenvolvimento do sistema nervoso deste (Levine, 1991), podendo gerar também diminuição da frequência cardíaca e diminuição dos níveis de hormônio de crescimento (GH). Afastamento maternal leva também a um aumento na resposta da adrenal para o ACTH exógeno. Estas mudanças são normalizadas com o retorno da mãe ao ninho (Hofer, 1973)

Dong et al. (1997) observaram que as fêmeas que tinham seus filhotes manipulados aumentavam a frequência de lamber os filhotes quando comparadas às fêmeas com filhotes não manipulados, evidenciando que estes comportamentos podem ser regulados pela interação mãe-filhote. Este dado é consistente com o fato da manipulação neonatal aumentar a vocalização ultrasônica em filhotes, gerando um aumento dos cuidados com os mesmos. Variações no cuidado maternal afetam o desenvolvimento de diferenças individuais em respostas neuroendócrinas ao estresse. Quando adultos a ninhada das mães que mostraram maior cuidado com os filhotes durante os primeiros 10 dias de vida tiveram uma redução do hormônio

adrenocorticotrófico no plasma, aumento da expressão de receptores para glicocorticóides no hipocampo, aumento da sensibilidade na retroalimentação dos glicocorticóides e diminuição dos níveis de hormônio liberador corticotrófico.

Trabalhos realizados em ratos, analisando o efeito da separação do filhote da mãe e também de seus irmãos, mostraram que o aumento do nível de corticosterona ocorre em qualquer tipo de separação mesmo permanecendo o contato visual (Wiener et al., 1990; Bayart et al., 1990).

Assim, postula-se que seria a perturbação da relação mãe-filhote que induziria ao padrão comportamental e endócrino observado na vida adulta do rato manipulado no período neonatal.

Os resultados da estimulação neonatal na agressão são contraditórios. Levine & Lewis (1959) demonstraram um aumento na agressividade em camundongos machos, enquanto Hilakivi-Clarke et al. (1991) não obtiveram nenhum efeito significativo em ratos machos.

Em ratos machos Wistar a agressividade é mínima, sendo que somente nas fêmeas no período pós-parto (3^o ao 11^o dias) a agressividade é melhor evidenciada e possível de ser analisada. O comportamento agressivo de fêmeas lactantes frente a um macho intruso é um comportamento padronizado, sendo que em nosso laboratório este comportamento tem sido estudado sob vários aspectos (Lucion & De Almeida, 1996).

Em relação ao comportamento sexual, quando ratos machos submetidos a estimulação neonatal (baixa temperatura) foram comparados com os controles não mostraram diferenças significantes no comportamento copulatório frente a fêmeas em estro. Marinari et al. (1976) demonstraram que o aumento

da atividade adrenocortical em ratos machos adultos está associada a diminuição da resposta sexual. Segarra et al. (1991) administraram ACTH em animais pré e pós natal e verificaram que o comportamento sexual em machos diminuiu, porém não há diferenças em relação aos níveis plasmáticos de testosterona. Em fêmeas, a estimulação neonatal atenuou ou preveniu a indução do diestro constante deflagrado por um modelo de estresse crônico imprevisível (o animal não tinha controle do tipo de estresse que seria administrado durante o período) na adolescência (Gonzalez et al., 1994).

Os resultados do comportamento de ratos em uma situação sem possibilidade de fuga (teste de nado forçado) também foram contraditórios. Hilakivi-Clarke et al. (1991) mostraram que ratos adultos que foram manipulados durante o período neonatal ficam menos imóveis do que os não manipulados no mesmo período, o que pode indicar uma melhor resposta a estímulos ambientais novos. Por outro lado, Gonzalez et al. (1990) mostraram que não há diferenças entre animais manipulados e não manipulados no período neonatal, quando analisados no teste de nado forçado, somente quando os animais adultos foram submetidos a um novo estímulo estressor 24 hrs antes do teste. Nesse último caso, os animais manipulados na infância mostraram uma redução no tempo de imobilização quando comparados aos animais não manipulados no mesmo período.

Os efeitos da manipulação pós-natal na função do HPA são opostos, em alguns aspectos, aos produzidos pelo estresse pré-natal. Ratos estressados no período pré-natal, quando submetidos a um novo estresse por choque antes dos 21 dias de idade exibem uma elevação da secreção de ACTH e

corticosterona, um efeito que aparentemente desaparece na adolescência (Takahashi et al., 1992a). Os efeitos do estresse pré-natal são dependentes do sexo. McCornick et al. (1992) verificaram que animais que sofreram estresse pré-natal, quando submetidos a um estresse de contenção na idade adulta, mostram um aumento de ACTH e corticosterona (CORT) no plasma em fêmeas, efeito que não se repete nos machos. Animais que sofreram estresse pré-natal mostram um exagerado aumento do medo quando adultos, analisados no labirinto, mostrando um aumento do comportamento de imobilidade e da defecação bem como aumento da vocalização. No campo aberto mostram uma diminuição do comportamento de locomoção (Fride et al., 1986; Suchecki & Neto, 1991; Takahashi et al., 1992b).

A manipulação neonatal aumenta a latência de lambar a cauda no teste de "tail-flick" e aumenta a hipoalgesia induzida por morfina tanto no "tail-flick" quanto na "hot plate" (D'Amore et al., 1991; Pieretti et al., 1991). Estes dados sugerem que a manipulação neonatal produz efeitos nos sistemas antinociceptivos, ocorrendo concomitantemente com alterações na função do eixo HPA.

As alterações comportamentais (aumento do medo, comportamento de imobilidade e defecação) observadas no labirinto em animais que sofreram estresse pré-natal podem ser neutralizadas pela estimulação neonatal, mostrando um efeito contrastante entre os dois períodos de estresse (Wakshlak, 1990).

A manipulação neonatal aumenta os receptores glicocorticóides tipo II no córtex frontal e hipocampo, as diferenças no estresse induzindo secreção de

CORT e ACTH podem representar aumento na sensibilidade para glicocorticóides (Meaney et al., 1985c, 1989,1991).

1.6. Estresse neonatal e hormônios gonadais

Os hormônios gonadais tem papel decisivo sobre o desenvolvimento do sistema nervoso durante o período crítico (duas primeiras semanas de vida). Neste período, os hormônios gonadais têm a função de organizar permanentemente o SNC principalmente o padrão fisiológico da função reprodutiva (Young, 1961; Levine & Mullins, 1964). A ação dos esteróides no animal neonato altera o padrão e provavelmente a quantidade da secreção de hormônios quando adultos. Os esteróides presentes nesta idade determinam as respostas dos hormônios centrais, que controlam o comportamento sexual no animal adulto (Levine & Mullins, 1966).

Tomando como parâmetros as mudanças fisiológicas e morfológicas para o desenvolvimento de ratos de ambos sexos, os mesmos foram divididos em 5 períodos: neonatal, infantil, juvenil, peripuberal e puberdade. Sendo que em machos o período neonatal compreende a primeira semana de vida; o período infantil compreende a segunda e a terceira semanas de vida; o período juvenil vai do 21^o ao 33^o dias de vida, o período peripuberal começa no 33^o dia de idade e cai até o aparecimento de espermatozóides maduros nos vasos deferentes; a partir daí inicia-se a puberdade em torno dos 55 dias de idade. Nas fêmeas os períodos estão distribuídos do mesmo modo, porém a fase

peripuberal termina com a ocorrência da primeira ovulação (em torno dos 38 dias de idade) (Ojeda et al., 1980).

O desenvolvimento dos ratos em relação a parte hormonal ocorre da seguinte maneira: em torno do 12º dia fetal pode ser detectado a presença de LHRH hipotalâmico (Critchlow & Elwers Bar-Sela, 1967). A pituitária está vascularmente conectada ao cérebro em torno do 12º ao 14º dias fetal, sugerindo uma função trófica essencial do LHRH para a diferenciação da pituitária (Szabo & Csanyi, 1982; Fink & Smith, 1971). O nível de LHRH mantém-se baixo até o 18º dia, quando começa a aumentar paulatinamente, com um substancial aumento no dia do nascimento (Chiappa & Fink, 1977; Nemeskéri et al., 1983; Aubert et al., 1985).

O LH começa a ser detectado por volta do 17º dia fetal e a resposta ao LHRH já pode ser observada. O FSH torna-se detectável em torno do 19º dia fetal.

No período pós-natal, logo após o nascimento, os níveis de FSH no plasma começam a aumentar, chegando a um nível máximo no 12º dia, e declinando gradualmente até o fim do período peripuberal. O nível de LH é mais elevado na fase neonatal do que na fase juvenil, mas a elevação é menos evidente que àquela do FSH. O nível de LHRH hipotalâmico aumenta marcadamente entre o dia do nascimento e o fim do desenvolvimento juvenil (Araki et al., 1975; Nemeskeri et al., 1983; Aubert et al., 1985). LHRH é substancialmente mais baixo durante o período neonatal-infantil do que durante o desenvolvimento juvenil e pré-pubere (Hompeš et al., 1982).

Andrógenos, principalmente a testosterona ou seus metabólitos, são secretados em uma alta concentração durante a vida fetal (Vom Saal & Bronson, 1980) e induzem as mudanças na morfologia, fisiologia e comportamento do animal. O mais alto índice de testosterona no plasma ocorre durante o parto e 6 hs após começa a declinar (Corbier et al., 1978; Slob et al., 1980; Gogan et al., 1981), esta elevação de testosterona está associada a um aumento na concentração hipotalâmica de estradiol (Rhoda et al., 1984). Estes dados sugerem que o aumento da testosterona contribui para a diferenciação do cérebro em relação ao comportamento sexual em machos, agindo por via estrogênica (Corbier, 1985).

A revisão da literatura mostra que as respostas comportamentais de machos e fêmeas em um mesmo teste com um mesmo tratamento são diferentes. As fêmeas são menos comprometidas emocionalmente que os machos, pois tem menos medo e ansiedade e maior locomoção quando comparados aos machos do mesmo grupo (Denenberg et al., 1973). As fêmeas também exploram mais novos territórios (Zimbardo & Montgomery, 1957; Richards & Leslie, 1962) e têm uma resposta mais rápida em testes de fuga (Levine & Broadhurst, 1963). A exibição do comportamento sexualmente dimórfico em roedores é dependente da qualidade e quantidade de hormônios esteróides no período de desenvolvimento (Meisel et al., 1979).

As diferenças sexuais no comportamento emocional entre ratos machos e fêmeas, em parte pelo menos, dependem da diferenciação sexual do sistema endócrino. A diferenciação sexual é afetada pela administração neonatal de hormônios.

Clark (1934), em um experimento em machos e fêmeas submetidos a castração com 1 ou 2 dias de vida, verificou que em machos castrados comparados ao controle, ocorreu um aumento da concentração dos hormônios gonadotróficos, gerando uma diminuição das diferenças sexuais entre machos e fêmeas.

A administração de andrógenos no período neonatal (4 ou 5 dias de idade) aboliu o ciclo ovariano em ratas fêmeas (Harris & Levine, 1962) e produziu uma esterilidade permanente em ratos machos. Nos machos ocorreu também uma redução do peso dos órgãos reprodutivos (Swanson & Vander Werff tem Bosch, 1964). O tratamento com estrógeno também afeta o ciclo ovulatório da mesma maneira que os andrógenos (Levine & Mullins, 1964). Em relação ao comportamento sexual, administração neonatal de estrógeno e testosterona, aboliu a receptividade sexual em ratas fêmeas, e estrógeno mais não andrógeno (Whalen, 1964) reduziu o comportamento sexual do rato macho (Harris & Levine, 1962; Whalen & Nadler, 1963).

A administração perinatal de esteróides sexuais alteram vários comportamentos não sexuais (Young et al., 1964). Gray et al. (1965) demonstraram que a injeção de estrógeno (5^o dia neonatal) diminuiu a emocionalidade no teste de campo aberto, afetando ambos os sexos.

Becker & Iles (1985) mostraram que a proteína de ligação de andrógenos (ABP) encontra-se numa concentração mais baixa em ratos de ambos os sexos do 18^o dia pós-concepção ao 4^o dia pós-natal, a ABP possui um padrão de secreção semelhante ao da testosterona neste período, com picos no 18^o dia pós-concepção e no parto, acompanhando o padrão de secreção de

testosterona no período crítico neonatal. A separação do filhote da mãe imediatamente após o nascimento produz uma elevação do nível de testosterona bem como do nível de ABP (Slob et al., 1980).

A sensibilização ao estresse no período de desenvolvimento do rato pode causar alterações permanentes no comportamento do animal. Nos ratos, estresse de contenção e calor no período pré-natal, causa em relação ao comportamento copulatório, desmasculinização e feminilização nos filhotes (Meisel et al., 1979). Em camundongos, o mesmo tipo de estresse no mesmo período, mostra efeitos similares na expressão típica do macho e também no comportamento de agressão entre machos e atividade locomotora (Kinsley et al., 1996).

A rata fêmea secreta mais prolactina em resposta ao estresse, efeito que não é observado quando a mesma se encontra no período de lactação.

A exposição de fêmeas prenhas a um ambiente estressor pode modular a esteroidogênese gonadal (Orth et al., 1983). Esteróides sexuais afetam vários aspectos da resposta ao estresse. Há diferenças sexualmente dimórficas ou dependentes de esteróides na resposta do ACTH e corticóides para o estresse. Imobilização aumenta os níveis de ACTH e CORT rapidamente em ratos machos e fêmeas e diminuiu os níveis de GH nos machos (Aloisi et al., 1994; Honda et al., 1994).

A resposta da prolactina a um único estresse de imobilização não mostrou nenhuma alteração tanto em ratos machos como nas fêmeas (Kant et al., 1983). Fêmeas e machos castrados mostraram um aumento de arginina-vasopressina (AVP) no plasma após o estresse (Carter et al., 1986). Diferenças

entre os sexos na estrutura (organização sináptica no núcleo ventromedial do hipotálamo (Matsumoto & Arai, 1986) ou na função do sistema transmissor pode fundamentar a discrepância da resposta ao estresse.

1.7. Estimulação neonatal e densidade neuronal

Identificação e caracterização dos fatores que permitem o nascimento neuronal e migração em alguns sistemas adultos podem levar a um melhor entendimento de como estes processos são terminados em várias regiões do cérebro. Os dados da neurogênese em ratos adultos têm sido bem documentados em somente dois sistemas dos mamíferos, o giro denteado (Bayer et al., 1982; Cameron et al., 1993) e o bulbo olfatório (Altman, 1969; Kaplan et al., 1985). O desenvolvimento do cérebro do rato é marcado por 3 fases: período embrionária, período pós-natal e adolescência. Essas fases se caracterizam pelos processos de neurogênese e gliogênese, migração de neurônios de seus lugares de nascimento para a camada celular granular e morte celular. A população progenitora de células está localizada em diferentes regiões durante a gestação, período pós-natal e adolescência. As taxas de nascimento celular, migração e morte são mais baixas na adolescência do que durante o desenvolvimento, no giro denteado e hipocampo, regiões que esses processos já foram estudados (Rickmann et al., 1987; Gould et al., 1991).

No período pós-natal, durante as duas primeiras semanas de vida, a maioria das células granulares do giro denteado e hipocampo estão nascendo (Schlessinger et al., 1975; Bayer, 1980), gliogênese é também máxima nesta

fase (Rickmann et al., 1987). Os neurônios granulares nascem na zona proliferativa secundária do hilus e migram presumivelmente ao longo das fibras gliais radiais, para residir na camada celular granular. Nesta fase ocorre também uma intensa morte celular, que se caracteriza por um significativo aumento na densidade de células picnóticas e uma significativa diminuição da densidade de células saudáveis. Esta fase ocorre entre o 4^o e 6^o dias pós-parto, precede imediatamente e sobrepõe-se ao tempo de máxima neurogênese. Depois da segunda semana pós-natal, nascimento celular, migração e morte diminuem a níveis baixos semelhantes aqueles nos adultos (Gould et al., 1991; Schlessinger et al., 1975).

Evidências mostram que o desenvolvimento neuronal está relacionado aos níveis dos esteróides adrenais. Na vida do animal a neurogênese, migração neuronal e morte celular correlacionam-se negativamente com os esteróides adrenais. No período embrionário, ocorre uma elevação dos níveis dos hormônios adrenais e baixa nos processos neuronais citados anteriormente, porém após o parto (duas primeiras semanas de vida) os níveis hormonais baixam e nascimento, migração e morte celular são máximos (Schlessinger et al., 1975; Rickmann et al., 1987; Gould et al., 1991). Após este período os níveis de hormônios adrenais elevam-se novamente e mantêm-se altos até a adolescência (Sapolsky & Meaney, 1986). Coincidentemente, os processos de nascimento, migração e morte neuronal diminuem. Esta relação temporal apresenta a possibilidade dos esteróides adrenais controlarem naturalmente a produção, migração e sobrevivência dos neurônios durante a vida do animal.

Uma característica importante do SNC é a plasticidade cerebral, definida como mudanças observadas na estrutura e na função do SNC ao nível celular, levando à plasticidade comportamental (Cotman et al., 1994). O termo plasticidade comportamental, introduzido em 1890 por William James, refere-se a qualquer mudança significativa no comportamento (Cotman et al., 1994). Esses mesmos autores defendem a idéia de que modificações sinápticas espontâneas ou naturais ocorrem no sistema nervoso maduro, e que esta forma de sinaptogênese natural pode ser regulada pelos mesmos fatores que operam durante períodos precoces do desenvolvimento nervoso (Finger & Almlí, 1985). Recentes estudos demonstraram que o cérebro tem uma excepcional capacidade plástica que se estende por toda vida (Cotman et al., 1994).

O melhor estímulo para a plasticidade cerebral é a experiência e, dependendo da intensidade ou do tipo de estimulação, produz inúmeras mudanças cerebrais, incluindo aumento do comprimento de dendritos, aumento ou diminuição na densidade de espinhos dendríticos, formação sináptica, aumento na atividade glial e alterações na atividade metabólica. Essas mudanças anatômicas, que também podem ser causadas por lesões do SNC, estão relacionadas à diferenças comportamentais entre os indivíduos e podem ser afetadas por vários fatores incluindo idade, hormônios gonadais, fatores tróficos, estresse e patologias cerebrais (Zilles, 1992; Kolb & Whishaw, 1998). A idéia de que a experiência possa modificar a estrutura cerebral foi enunciada por volta de 1890 (Ramon Y Cajal, 1928). Nesta época foi sugerido que o cérebro poderia armazenar uma variedade de informações ambientais por modificar as conexões sinápticas entre as células (Kolb & Whishaw, 1998).

O ambiente pode atuar sobre conexões sinápticas a partir de dois mecanismos básicos: primeiro, experiências ambientais podem estimular o crescimento de processos neurais e a formação de novas conexões entre os neurônios; segundo, as experiências ambientais podem reforçar conexões que estão intrinsecamente determinadas. Novas conexões, tal como proposto pela primeira teoria, poderiam explicar a aquisição de novas capacidades comportamentais (Greenough, 1975).

A amígdala é uma estrutura de conformação esferóide e alongada, composta por um conjunto de núcleos subcorticais, que se localiza no lobo temporal anterior, lateral ao hipotálamo e ventral ao estriado (Paxinos & Watson, 1998). A amígdala é considerada parte do sistema límbico e está relacionada a inúmeras funções. Essa estrutura modula atividades relacionadas com a percepção e a elaboração de respostas a estímulos em que o medo e a ansiedade estejam envolvidos, percebe informações olfativas e hormonais e afeta a ocorrência de comportamento reprodutivo. Também, participa do aprendizado e da formação de memória, e associa a atividade vegetativa com a ocorrência desses comportamentos (Mascò & Carrer, 1990; Quirk et al., 1995; Swanson & Petrovich, 1998). A amígdala recebe vários tipos de informações sensoriais, interoceptivas e exteroceptivas, modificando sua própria atividade no que se supõe seja uma etapa na apreciação emocional da informação recebida, e estimula diversas regiões do SNC para que se inicie a resposta ao estímulo (Quirk et al., 1995). Desse modo, para adequar a relação do animal ao seu ambiente, a amígdala pode modular comportamentos e alterações vegetativas e endócrinas (Davis, 1992). Em resposta a estímulos aversivos

visuais ou auditivos, impulsos nervosos provenientes do tálamo e do córtex cerebral chegam às regiões amigdalianas lateral e basolateral, onde estão os núcleos basal e basal acessório. A seguir, eles são transmitidos principalmente ao núcleo central da amígdala, o qual emite eferências para o hipotálamo e para o tronco encefálico, onde as respostas comportamentais relacionadas com medo e as respostas vegetativas simpática e parassimpática são organizadas. Isso faz com que o animal paralise sua atividade atual e fique preferencialmente em posição imóvel, aumente sua atenção em relação ao ambiente, fique taquipnéutico e taquicárdico, tenha elevação da pressão arterial e aumente a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (Davis, 1992).

A amígdala medial (AMe), também pode modular a ocorrência de comportamentos, como é o caso dos comportamentos sexual, agressivo e de aprendizado onde o componente emocional está envolvido (Wood & Newman, 1995). Para isso, a AMe estabelece conexões, muitas delas recíprocas, com outras regiões dentro da própria amígdala, como é o caso do núcleo central, o bulbo olfatório, o órgão vomeronasal, o hipocampo, o estriado e o globo pálido ventral, núcleo próprio da estria terminal, o hipotálamo, o tálamo, a substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo e os núcleos da rafe mesencefálicos (Wood & Newman, 1995; Guillamón & Segovia, 1997). A lesão da parte anterior da AMe e da amígdala cortical diminui a ocorrência de comportamento sexual em ratas. A estimulação dessas mesmas regiões promove o efeito oposto (Mascó & Carrer, 1990). Em machos, a lesão da AMe prejudica a ocorrência de ejaculação (Harris & Sachs, 1975). Quando analisada através de eletroencefalografia, a estimulação da AMe mostra uma atividade praticamente

indistinguível do período de inatividade motora observada no período pós-ejaculatório (Smock et al., 1992). O papel da AMe sobre o comportamento sexual e a própria atividade reprodutiva pode ser influenciado por hormônios gonadais (Guillamón & Segovia, 1997).

Receptores para hormônios gonadais são encontrados na AMe de ratos (Osterlund et al., 1998) em quantidade comparável ao observado no hipotálamo (Simerly et al., 1990). Receptores alfa e beta para estrógeno são encontrados tanto na porção anterior quanto na posterior da AMe (Osterlund et al., 1998). Igualmente, a aromatase é encontrada na AMe, esta enzima tem alta atividade durante o período crítico neonatal de maturação do sistema nervoso (Shinoda et al., 1994).

A AMe de ratos é sexualmente dimórfica, isto é, a área total da AMe é maior em ratos machos do que em fêmeas (Hines et al., 1992). Dimorfismo sexual pode ocorrer também em regiões que estão relacionadas com a AMe.

A amígdala forma um circuito sensível aos hormônios gonadais que integra informações olfativas, esteróides sexuais e a própria atividade intrínseca neuronal desse núcleo amigdaliano (Guillamon & Segovia, 1997).

Vários estudos indicam que a importância da amígdala está na expressão das mudanças autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais que ocorrem em resposta ao medo ou ao estímulo aversivo. Destruição da amígdala reduz várias medidas do medo e da ansiedade. O núcleo amigdalóide central é o mais envolvido na mediação de respostas associadas com estresse condicionado e aprendizado. Ablação bilateral do núcleo amigdalóide central, impede ou bloqueia a resposta ao estresse. Estas respostas incluem frequência

cardíaca, pressão sanguínea e secreção de corticosterona (Iwata, 1987; Beaulieu et al., 1987). Estes dados sugerem que a amígdala regula a resposta ao estímulo estressor, estimulando ou impedindo a passagem do estímulo à outras áreas do cérebro (Gloor, 1986). A percepção do medo através da estimulação amigdalóide está estreitamente relacionada e usualmente associada com memórias de experiências anteriores. A estimulação induz medo acompanhada por um aumento da frequência cardíaca e pressão sanguínea, dilatação da pupila e distração da expressão facial (Stock, 1981; Iwata, 1987). Em situações de estresse e ansiedade ocorre a ativação do núcleo amigdalóide central. Os neurônios amigdalóides, que secretam CRH, são ativados durante o estresse (Honkaniemi, 1992). Estima-se que em torno de 1750 neurônios que sintetizam o CRH estejam localizados em cada lado do núcleo amigdalóide central (Gray, 1990). Em ratos, a resposta de corticotrofina ao estresse é caracterizada por um aumento na secreção do ACTH pela hipófise o que leva à liberação de corticosterona pelo córtex adrenal.

Lesão bilateral da CeA reduz significativamente a resposta ACTH/corticosterona ao estresse de imobilização. O estresse de imobilização resulta em aumento da atividade noradrenérgica na CeA, sugerindo um papel facilitatório para noradrenalina (Beaulieu, et al., 1987).

Poucas investigações histológicas têm sido realizadas para verificar o efeito da manipulação neonatal no desenvolvimento do cérebro. Alguns trabalhos mostram que a manipulação neonatal leva a um aumento do número de células gliais no córtex cerebral (Altman et al., 1968; Szeligo & Leblond, 1977). Szeligo & Leblond (1977), encontraram no córtex occipital, um

significativo aumento no número de astrócitos aos 50 dias de idade em animais que foram manipulados na fase neonatal. Os autores sugerem que o aumento no número de astrócitos no córtex, foi uma resposta ao aumento da atividade neuronal associada com a manipulação.

A proliferação de células pós-natal no giro denteado do hipocampo é maior em filhotes manipulados entre o 2^o e 11^o dias da fase neonatal do que em filhotes não manipulados (Altman et al., 1968).

Apoptose é a morte programada da célula, processo que ocorre durante a maturação do sistema nervoso (Kerr et al., 1987) em função de uma variedade de circunstâncias, incluindo seleção de células imunes, carcinogênese e desenvolvimento (Raff et al., 1993; Majno & Joris, 1995). Esse é um processo fisiológico de eliminação da célula, durante o qual, em contraste com a necrose, não há indução de resposta inflamatória (Duvall, et al., 1985; Fadok et al., 1992). A apoptose começou a ser descrita 25 anos atrás por Kerr et al. (1972) e recentemente tem sido implicada em muitos processos patológicos. Em contraste com a necrose, que é tipicamente causada pelo rápido aumento do volume e lise da célula, a morfologia da célula apoptótica exibe condensação da cromatina contra a membrana nuclear, encolhimento da célula com preservação de organelas e partículas membranosas do núcleo e citoplasma, conhecida como corpos apoptóticos. Durante a apoptose, organelas intracelulares como as mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, permanecem intactas. Em comparação com a necrose, a apoptose é um processo mais lento (Bonfoco et al., 1995) e frequentemente depende da expressão gênica e síntese de proteínas específicas (Deckwerth & Johnson,

1993). Morte apoptótica requer, em muitos casos, uma ativação do programa da própria destruição, usualmente chamada de morte programada da célula (PCD-programed cell death), incluindo autodigestão, com ativação de proteases e endonucleases. Uma das características marcantes deste processo é a degradação do DNA nuclear, detectada por visualização da quebra de bandas de DNA e fragmentos de DNA do tamanho de nucleosomos através da técnica de eletroforese gel (Wyllie, 1980; Gavrieli et al., 1992).

Embora haja controvérsias, o papel da apoptose em condições neuropatológicas está começando a emergir. Por exemplo, a fragmentação do DNA acontece concomitantemente a morte neuronal em modelos de isquemia (Macmanus et al., 1993; Pollard et al., 1994; Charriaut-Marlangue et al., 1996). Durante o desenvolvimento do SNC é sabido que os neurônios sofrem PCD (Oppenheim, 1991). O PCD em neurônios ocorre não somente em desordens neurodegenerativas, semelhantes às doenças de Alzheimer, Parkinson e outras (Choi, 1992; Arenas, 1994; Isacson, 1993; Ziv et al., 1994; Giese et al., 1995; Portera & Cailliau, 1995), mas também em deficiências metabólicas tardias do cérebro, acompanhadas de isquemia ou doença epiléptica. Portanto, a morte programada da célula é provavelmente intrínseca para cada neurônio e pode ser ativada por várias condições patológicas. Muitas dessas substâncias mediadoras de neurônios apoptóticos "in vivo" são também efetivas na indução de apoptose em sistemas de cultura neuronal. Tem sido recentemente mostrado que a excitação por aminoácidos, glutamato (Didier et al., 1996), hipóxia e óxido nítrico (Palluy et al., 1996), oxigênio reativo, dopamina (Ziv et al., 1994), e beta amilóide (Loo et al., 1993) e capaz de induzir apoptose em

neurônios. Após o traumatismo da medula espinhal no rato, ocorre tipicamente necrose pós-traumática, mas em adição, células apoptóticas foram encontradas de 6 horas a 3 semanas após o ferimento, especialmente na substância branca da espinha. Células apoptóticas eram positivas para marcadores oligodendrócitos.

Aumento da apoptose tem sido verificado após isquemia ou ferimento traumático do SNC, sugerindo que a morte da célula ativa assim como a necrose passiva, podem aumentar os danos de um ferimento no SNC. Após o ferimento da medula espinhal em macacos, células apoptóticas foram encontradas dentro das áreas fibrosas de degeneração remota.

Ambos, a degeneração secundária da medula espinhal ferida e a desmielinização crônica de áreas fora do ferimento, surgem para fazer parte da apoptose. O traumatismo no SNC inicia processos secundários de aumento de danos além do local do ferimento inicial. A degeneração secundária tem sido atribuída a uma variedade de mecanismos evoluindo de danos da célula primária e necroses, incluindo influxo de cálcio, rompimento da membrana plasmática e peroxidase lipídica, esta última mediada por radicais livres (Loo et al., 1993).

2. OBJETIVOS

2.OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo analisar os efeitos da estimulação neonatal sobre vários comportamentos na fase peripuberal e adulta, como: campo aberto com o predador, labirinto em cruz elevado, labirinto aquático de Morris, comportamento sexual de machos, comportamento agressivo maternal, teste de nado forçado e habituação no campo aberto. Também analisou os efeitos da estimulação sobre o desenvolvimento do sistema nervoso de ratos machos e fêmeas. Os animais no período neonatal (do dia 1^o ao 10^o dia pós-parto) foram submetidos diariamente aos seguintes procedimentos de estimulação: manipulação por 1 minuto ou estimulação por 10 min, por frio, luz e som. Os animais do grupo controle não sofreram nenhum tipo de estimulação ou manipulação durante os 10 primeiros dias de vida.

O trabalho foi dividido em vários experimentos cujos objetivos específicos foram os seguintes:

1. analisar o efeito da estimulação neonatal sobre os seguintes comportamentos de ratos machos e fêmeas adultos:
 - 1a. teste do campo aberto com predador
 - 1b. teste do labirinto em cruz elevado
 - 1c. comportamento agressivo maternal
 - 1d. comportamento sexual de machos com e sem experiência sexual prévia
 - 1e. habituação no campo aberto
 - 1f. teste do labirinto aquático de Morris
 - 1g. teste do nado forçado (Porsolt)

2. analisar o efeito da estimulação neonatal sobre os seguintes comportamentos de ratos machos e fêmeas pré-púberes:
 - 2a. teste do campo aberto com predador
 - 2b. teste do labirinto em cruz elevado

3. analisar o efeito da estimulação neonatal sobre os seguintes comportamentos de ratos machos adultos castrados antes da puberdade:
 - 3a. teste do campo aberto com predador
 - 3b. teste do labirinto em cruz elevado

4. analisar o efeito da estimulação neonatal sobre a densidade de neurônios na amígdala medial e córtex pré-frontal em ratos machos e fêmeas com 11, 35 e 75 dias de idade.

5. analisar o efeito da estimulação neonatal sobre a apoptose neuronal na amígdala medial em ratos machos e fêmeas aos 5 dias de idade.

Os experimentos de análise do comportamento foram realizados com o objetivo de se obter um quadro amplo das alterações produzidas pela estimulação neonatal. Os trabalhos até então tinham se detido em analisar comportamentos de locomoção em ambientes novos. Os resultados dos efeitos da estimulação neonatal sobre vários outros padrões comportamentais, como o sexual e o agressivo, são contraditórios. Além disso, nenhum trabalho da literatura havia analisado os efeitos da estimulação neonatal sobre os

comportamentos de animais sexualmente imaturos (peripuberais). Da mesma forma, o papel modulatório dos hormônios gonadais sobre os efeitos comportamentais da estimulação neonatal não tinha sido especificamente focado até então. No entanto, alguns dados de literatura indicavam que a estimulação neonatal poderia ser afetada pelos hormônios gonadais. Esses trabalhos mostravam que a estimulação neonatal produzia efeitos comportamentais diferentes entre machos e fêmeas. Os hormônios gonadais são importantes fatores na diferenciação do sistema nervoso durante o período neonatal.

Para explicar as alterações comportamentais nos animais adultos estimulados no período neonatal é necessário imaginar que aquela estimulação produz uma (ou várias) alteração estável e de longa duração no sistema neuroendócrino, o que explicaria os efeitos comportamentais. Considerando que a estimulação é aplicada aos animais durante o período neonatal, quando ocorrem vários processos de diferenciação do sistema nervoso (nascimento, migração e morte neuronal), propomos analisar os efeitos daquela estimulação sobre a densidade neuronal na amígdala medial e córtex pré-frontal, áreas essas que estão envolvidas com comportamentos emocionais analisados neste trabalho. Nossa hipótese básica era de que a estimulação neonatal afetaria o processo de diferenciação do sistema nervoso, levando a uma alteração do número de neurônios.

CAPÍTULO 1

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE
COMPORTAMENTOS DE RATOS AOS 70-80 DIAS DE IDADE**

CAPÍTULO 1

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE COMPORTAMENTOS DE RATOS NA IDADE ADULTA (70-80 DIAS DE IDADE)

Objetivos específicos Este capítulo analisou as alterações comportamentais em animais adultos (70-80 dias de idade) geradas pela estimulação neonatal. Os animais foram estimulados no período neonatal (1^o ao dia 10^o) e quando adultos foram testados no campo aberto com predador, labirinto em cruz elevado, nado forçado, comportamento agressivo maternal, comportamento sexual de machos, habituação e labirinto aquático de Morris.

1.MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Animais

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da variedade Wistar provenientes dos biotérios do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS e da Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre. Os animais foram estudados aos 70 ou 80 dias de idade, conforme o comportamento analisado, divididos nos seguintes grupos experimentais :

- a) Grupo I - INTACTO - animais que não foram manipulados pelo experimentador nem/ou pelos tratadores durante todo período de amamentação;
- b) Grupo II - MANIPULAÇÃO - animais foram gentilmente manipulados pelo experimentador por 1 min uma vez por dia durante os 10 primeiros dias de vida;
- c) Grupo III- ESTIMULADOS - animais que foram submetidos a estimulação aversiva pelo experimentador por 10 min uma vez por dia durante os 10 primeiros dias de vida.

Em torno de 7 dias antes do parto, as fêmeas grávidas foram colocadas em caixas individuais. O dia do nascimento (dia 0) foi controlado rigorosamente e a ninhada padronizada em 8 filhotes por mãe. No dia seguinte ao nascimento dos filhotes, foi iniciado o procedimento de manipulação ou estimulação aversiva. Logo após cada sessão de manipulação ou estimulação aversiva os filhotes retornaram para a caixa com a mãe. Depois desse período de estimulação neonatal, os ratos permaneceram com a mãe até o desmame (21 dias pós-parto) quando foram separados e mantidos em caixas (41x34x17cm) com animais do mesmo sexo e idade (de 2-5 animais por caixa) e tratados segundo a rotina padrão do biotério. Cada grupo experimental era formado por animais não pertencentes à mesma ninhada (não-irmãos). Todos os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas (período claro de 4:00 a 16:00). A temperatura foi mantida constante em torno de 22^o C. Os animais tinham livre acesso à água e a ração específica para roedores (Nutrilab, Brasil) durante todo o experimento.

1.2. Metodologia da Estimulação Aversiva

A estimulação aversiva consistia em remover os filhotes das mães, colocando-os juntos em um recipiente plástico pequeno forrado com toalha de papel e levá-los à uma sala diferente daquela onde se encontrava a mãe (sendo que a temperatura desta outra sala também foi mantida a 22^o C). Então os filhotes eram submetidos a um dos estímulos abaixo:

-Som: a estimulação por som consistia em expor os filhotes a um aparelho específico que emitia sons considerados som branco (considerado não decifrável pelo aparelho auditivo), durante 10 min, com um volume de 90 dcb (medido por decibelímetro), volume considerado aversivo até mesmo para a audição humana.

-Frio: a estimulação por frio consistia em expor os filhotes a uma temperatura de 0^o C, por 10 min, os animais eram colocados em um freezer com a temperatura controlada.

-Luz: a estimulação por luz consistia em expor os filhotes à uma lâmpada de 100 W durante o período escuro, também por 10 min.

As fontes de estimulação (luz e som) foram colocadas aproximadamente 30 cm longe dos filhotes. Embora filhotes de ratos na idade utilizada estejam com os olhos fechados, Routtenberg et al. (1978), mostraram que esses animais já com 6 dias de idade demonstram fototaxia negativa. A estimulação foi realizada durante 10 min durante os 10 primeiros dias de vida, sendo que os filhotes foram expostos aos diferentes tipos de estimulação de modo aleatório ao longo dos 10 dias experimentais. Esta sucessão de estímulos aleatórios é considerada mais aversiva do que a estimulação em que o animal tem o controle do mesmo. Durante o texto foram colocados o grupo manipulado e estimulado aversivamente no período neonatal como grupos experimentais.

1.3. Registro dos comportamentos

1.3.1) Campo-aberto com um predador

Foram analisados animais adultos (80 dias de idade) machos e fêmeas dos grupos intacto (N=12 machos e 12 fêmeas), manipulados (N=10 fêmeas e 10 machos) e estimulados (N=14 fêmeas e 12 machos).

Este teste é uma modificação do teste de campo-aberto padrão no qual um predador, dentro de uma gaiola de arame é colocado no campo-aberto, um procedimento que tende a aumentar a inibição do comportamento dos ratos (Lucion & De Almeida, 1996). O campo-aberto consistia de uma caixa de madeira medindo 1m² com 8 listas pintadas no chão (4x4 perpendiculares). O procedimento experimental consistiu em colocar o rato no campo-aberto com um predador natural, o gato (um animal adulto dócil feminino), sem contato físico entre eles, mas com percepção visual, auditiva e olfativa. A experiência foi dividida em 3 períodos seqüenciais durante os quais o comportamento do rato era continuamente filmado. Primeiro o rato foi colocado em um canto do campo-aberto

e filmado por 5 min (período antes do predador, período 1), com o rato ainda na arena, a gaiola com o gato foi colocada no campo-aberto (período na presença do predador, período 2) no canto oposto ao que o rato tinha sido colocado inicialmente e era realizado mais 5 min de filmagem. Após o predador era retirado do campo-aberto e o rato era filmado por mais 5 min (período após a retirada do predador, período 3). O tempo total de filmagem foi de 15 min por rato, sendo que no intervalo de um rato para outro o campo-aberto era limpo completamente com álcool. O teste foi realizado no período das 8:30 às 14:00 hs. Foram analisados os seguintes comportamentos dos ratos em cada período de 5 min:

- a) Duração da Locomoção: foi analisada a duração (tempo total em que o animal realizava o deslocamento no campo aberto).
- b) Duração da exploração da área do predador (gato): foi analisada a duração (tempo total que se encontrava na área em que está ou estará o predador).
- c) Duração de esquadrihar: foi analisada a duração (tempo total que o rato olhava para a área onde está ou esteve o predador).

Em analogia aos estudos prévios (Blanchard & Blanchard, 1998; Blanchard et al., 1990), a locomoção é uma medida da atividade geral do rato. Exploração da área do gato consiste em chegar a área e normalmente cheirar a gaiola ou o local onde estava a mesma. Por outro lado, esquadrihar consiste em uma atividade considerada de risco, na qual o rato não está de fato na área do gato, mas dirige sua cabeça para aquela área, utilizando provavelmente os sentidos visuais e ou olfativo.

1.3.2) Labirinto em cruz elevado

Foram analisados animais adultos, ratos machos e fêmeas (com 80 dias de idade) divididos nos grupos intacto, manipulados e estimulados, sendo que em cada grupo o N foi igual a 10 animais, tanto para machos quanto para fêmeas.

Os testes foram realizados no período das 8:30 às 14:00 hs. O teste consistia em colocar o animal no centro de um labirinto em formato de cruz, onde dois braços possuíam as laterais fechadas, não permitindo que o animal tivesse contato visual com o exterior. Os outros dois braços da cruz possuíam as laterais abertas permitindo ao animal uma visão para o exterior, bem como a possibilidade de colocar a cabeça para o lado de fora do braço, dando-lhe a noção da altura (70cm) em que o mesmo se encontrava. Cada animal foi avaliado por um tempo de 5 min. Após a retirada dos ratos do labirinto, esse era cuidadosamente limpo para colocação do próximo animal. Os comportamentos avaliados no labirinto em cruz elevada foram os seguintes:

- a) Permanência no braço fechado: nesse comportamento foram avaliados a frequência (número de vezes que o animal entrou no braço fechado) e duração (tempo de permanência total do animal no braço fechado).
- b) Permanência no braço aberto: nesse comportamento foram avaliados a frequência (número de vezes que o animal entrou no braço aberto) e duração (tempo de permanência total do animal no braço aberto).
- c) Cabeça para fora do braço aberto: nesse comportamento foi avaliado a frequência em que o animal colocara a cabeça para fora do braço aberto.
- d) Esquadrinhar: nesse comportamento foi avaliado a frequência, em que o animal colocava a cabeça para fora do braço fechado, sendo que a mesma deveria estar orientada visualmente para o lado do braço aberto.

Na avaliação comportamental no labirinto em cruz elevado existem 3 índices principais que foram analisados, que são os seguintes:

e) Porcentagem do número de vezes que o rato entra no braço aberto (PFBA): este índice corresponde à frequência de entradas no braço aberto dividida pela frequência total de entradas (frequência de entradas no braço aberto mais frequência de entradas no braço fechado).

f) Porcentagem do tempo que o rato permanece no braço aberto (PTBA): este índice corresponde ao tempo de permanência no braço aberto dividido pelo tempo total (tempo no braço aberto mais tempo no braço fechado).

g) Frequência total de entradas - corresponde ao número total de entradas nos braços aberto mais braço fechado.

1.3.3. Comportamento agressivo maternal

Foram analisadas ratas fêmeas (80 dias de idade), divididas em 3 grupos: intactas (N= 11), manipuladas (N=22) e estimuladas aversivamente no período neonatal (N=11). As fêmeas foram acasaladas em uma proporção de 1 macho para cada 3 fêmeas, depois de constatada a prenhez, através de inspeção visual e manual, as mesmas eram colocadas individualmente em caixas de observação de acrílico medindo 50x45x25 cm com quantidade suficiente de serragem a construção do ninho. O número de filhotes foi padronizado em 8 no dia do parto. No 7^o dia pós-parto, no período das 16:30 às 19:00 hs, era colocado um macho intruso na caixa a onde se encontravam a fêmea e os filhotes. Os diferentes comportamentos da rata em presença do macho intruso eram filmados por 10 min. Os intrusos eram machos jovens de tamanho e peso inferior aos das fêmeas e só eram utilizados uma vez. Neste e em outros estudos em nosso laboratório (De Almeida & Lucion, 1994; Consiglio & Lucion, 1996; Lucion & De Almeida, 1996), usando o mesmo teste, nenhum filhote foi atacado pelo intruso. Os comportamentos registrados durante os testes de agressão maternal foram (Lucion & De Almeida, 1996) os seguintes:

a) Investigação do Intruso: aproximação da fêmea para cheirar os órgãos genitais e/ou o corpo do intruso. Foram analisados os parâmetros frequência, latência e duração deste comportamento.

b) Ataque lateral : a fêmea move-se orientada lateralmente em direção ao intruso, normalmente associado a piloereção e morde a parte dorso-caudal (com exceção da cabeça) do corpo do intruso. Foram analisados os parâmetros frequência e latência deste comportamento.

c) Ataque frontal: a fêmea ataca a parte frontal do intruso, normalmente seguidas de mordidas na cabeça ou ombros do intruso. Foram analisados os parâmetros frequência e latência deste comportamento.

d) Morder: a fêmea morde qualquer parte do corpo do intruso. Foram analisados os parâmetros frequência e latência deste comportamento.

e) Boxear: a fêmea e o intruso elevam o corpo frontalmente um ao outro, e lutam com as patas dianteiras. Foram analisados os parâmetros frequência e latência deste comportamento.

g) Postura agressiva: a fêmea se coloca lateralmente ao intruso, normalmente associada a piloereção, não permitindo a movimentação do intruso. Foram analisados os parâmetros frequência e latência deste comportamento.

h) Interação com o filhote: quando a fêmea se encontra no ninho com os filhotes. Foram analisados os parâmetros frequência, duração e latência deste comportamento.

i) Arrumar o ninho: quando a fêmea faz movimentos no sentido de aumentar a quantidade de sepilho no ninho, como buscar com a boca ou atirar o sepilho em direção ao ninho com as patas traseiras. Foram analisados os parâmetros frequência, duração e latência deste comportamento.

1.3.4. Comportamento sexual masculino

Foram analisados ratos machos sexualmente adultos sem experiência sexual prévia (80 dias de idade) e machos sexualmente experientes (100 dias de idade). Tanto os machos sem experiência sexual quanto os sexualmente experientes foram divididos nos seguintes grupos: intactos (N=16 sem experiência sexual e N=30 com experiência sexual), manipulados (N=9 sem experiência sexual e N=11 com experiência sexual) e estimulados (N=14 sem experiência sexual e N=12 com experiência sexual). Todos os machos sem experiência sexual prévia foram colocados com fêmeas para adquirir experiência sexual e posteriormente utilizados no grupo de machos com experiência sexual, porém como mostra o N acima, alguns machos experientes não fizeram parte da análise comportamental como inexperientes.

O comportamento sexual foi registrado em caixas medindo 70x70x35cm, com paredes de aço, com exceção da parede frontal que era de vidro, permitindo a filmagem do comportamento. Os testes comportamentais foram registrados no período de 1-2 hs depois do início da fase escura (o período escuro iniciava às 16:00 hs), o registro era feito com a iluminação de uma lâmpada de 40-watt. Inicialmente, o macho foi colocado na caixa de observação por 10 min, antes da colocação da fêmea receptiva, para investigação e adaptação ao ambiente. Após o período de adaptação era colocada a fêmea receptiva e os comportamentos eram filmados por 10 min. As fêmeas utilizadas para a análise comportamental dos machos eram sexualmente experientes, ovariectomizadas e induzidas a receptividade sexual por injeções intramuscular de benzoato de estradiol (5 mg/rata) 48 hs e progesterona (5 mg/rata) 4 hs antes do início da filmagem do comportamento. Todas as fêmeas foram testadas antes do experimento com machos sexualmente ativos não pertencentes ao experimento para confirmação da receptividade sexual, somente as fêmeas que apresentaram lordose foram utilizadas. Os seguintes comportamentos foram registrados:

a) Cheirar Genitais: quando o macho aproxima-se da fêmea e cheira ou lambe a região genital. Foram analisados os parâmetros de frequência, latência e duração deste comportamento.

b) Monta: quando o macho persegue a fêmea e coloca as duas patas dianteiras na parte dorsal da fêmea com aproximação peniana, porém sem penetração e movimentos pélvicos. Foram analisados os parâmetros de frequência e latência deste comportamento.

c) Intromissão: quando o macho persegue a fêmea e coloca as duas patas dianteiras na parte dorsal da fêmea com introdução peniana na vagina seguido de movimento pélvicos. Foram analisados os parâmetros de frequência e latência deste comportamento.

1.3.5. Habituação no campo-aberto

Foram analisados animais adultos, ratos machos e fêmeas (com 80 dias de idade) divididos nos grupos intacto (N=18 machos e N=10 fêmeas), manipulados (N=13 machos e N=6 fêmeas) e estimulados (N=12 machos e N=11 fêmeas).

O experimento consistia em analisar cada animal por um período de 3 min durante 5 dias consecutivos, em um campo aberto medindo 60x40x50cm com 12 divisões quadradas marcadas no chão do campo medindo 13x13 cm cada uma, sendo que a parede frontal do campo aberto era de vidro permitindo a visualização do animal pelo experimentador. Após a análise comportamental de cada animal o campo aberto era totalmente limpo. Neste teste de habituação os seguintes comportamentos foram avaliados:

a) Locomoção: nesse comportamento foram avaliadas a frequência (número de vezes que o animal cruzava as divisões quadradas) e a duração da locomoção (tempo total em que o animal permanecia em deslocamento).

b) Investigar o ambiente (rearing): nesse comportamento foi avaliada a frequência (número total de vezes que o animal levantava as patas dianteiras sobre as paredes do campo-aberto) e a duração do “rearing” (tempo total que o animal permanecia com as patas dianteiras sobre as paredes do campo aberto).

1.3.6. Labirinto aquático de Morris - “Water-maze”

Foram analisados animais adultos, ratos machos e fêmeas (com 80 dias de idade) divididos nos grupos intacto (N=12 machos e N=11 fêmeas), manipulados (N=5 machos e N= 5 fêmeas) e estimulados (N=10 machos e N=12 fêmeas).

Esse experimento está relacionado com a capacidade de memória espacial do animal, consistia em filmar os animais em um aquário redondo de fibra de vidro com o fundo pintado em preto fosco, com luz indireta, medindo (1,5 m de largura x 0,50 de altura, sendo que a lâmina de água ficava a uma altura de 0,25 m), onde foram colocados 4 símbolos distribuídos simetricamente em torno do aquário, de modo que os animais pudessem visualizar quando estivessem na água. Para fins de análise o aquário foi dividido em 4 quadrantes, sendo que em um deles foi colocado uma plataforma acrílica, transparente, com base sólida, permitindo que a mesma permanecesse imóvel durante o teste. Essa plataforma foi colocada um pouco abaixo da água, sendo que o animal não poderia visualizá-la. A altura da água não permitia que o animal tocasse o fundo com as patas ou a cauda, fazendo com que o mesmo tivesse que nadar a procura da plataforma. O teste dividia-se em dois dias: no primeiro dia o animal era treinado a encontrar a plataforma por 8 vezes, cada uma das vezes era colocado no aquário em uma orientação diferente em relação ao local a onde se encontrava a plataforma. O intervalo entre os treinamentos foi de 2 a 5 min. O animal era analisado durante 2 min ou até que encontrasse a plataforma onde deveria permanecer 20s. Quando o animal não encontrava a plataforma nos 2 min de teste, o experimentador colocava o animal na mesma e o mantinha por 20 s. No segundo dia o animal era testado apenas uma vez, sendo que a orientação para colocação do animal no

aquário foi padronizada. Neste segundo dia a plataforma era retirada do aquário e foi controlada as vezes em que o animal passou no local onde estava a plataforma. O tempo de duração do teste foi de 2 min. A temperatura da água era mantida em torno dos 32-35^o C durante todo o experimento. Após a retirada do animal da água o mesmo era gentilmente seco e mantido em sala com aquecimento . Os comportamentos analisados foram os seguintes:

a)Frequência na plataforma: número de vezes que o animal cruzou o local onde se encontrava a plataforma no dia anterior ao teste (treinamento).

b)duração no quadrante 1: tempo total de permanência no quadrante 1, considerado o mais afastado do quadrante onde se encontrava a plataforma.

c)Duração no quadrante 2: tempo total de permanência no quadrante 2, que localizava-se subjacente ao quadrante onde se encontrava a plataforma.

d)Duração no quadrante 3: tempo total de permanência no quadrante 3, nesse quadrante estava localizada a plataforma no dia anterior ao teste (treinamento).

e)Duração no quadrante 4: tempo total de permanência no quadrante 4, que localizava-se subjacente ao quadrante onde se encontrava a plataforma.

1.3.7)Teste de Nado-Forçado

Foram analisados animais adultos, ratos machos e fêmeas (com 80 dias de idade) divididos nos grupos intacto, manipulados e estimulados, tendo cada grupo um N de 10 animais, tanto para machos quanto para fêmeas.

Os testes foram realizados no período das 8:30 até as 14:00 hs. Os ratos foram colocados para nado-forçado individualmente em um aquário de vidro coberto (25cmx25cmx40cm), onde foram colocados 28cm de água a 25^o C. Este volume de água impedia os ratos de tocar o fundo com as patas ou a cauda. Os

ratos foram submetidos ao procedimento de natação por 15min no primeiro dia (teste) e por 5 min no segundo dia (reteste). No término de cada sessão de natação, os ratos eram secos completamente com toalhas e aquecidos sob uma fonte de calor por 30 min (Porsolt et al., 1977). A filmagem foi realizada em ambos dias e a duração e frequência dos seguintes comportamentos foram analisadas:

a) Imobilidade: período que o animal ficava flutuando, com o nariz sobre a superfície da água e fazendo somente movimentos leves com as patas dianteiras para não submergir.

b) Mergulhar: período que o animal estava com o corpo totalmente submerso.

c) Nadar: período que o animal mostrava vigorosos movimentos, tanto no meio do aquário quanto próximo das bordas, e eventualmente, tentando escalar as paredes do aquário.

d) Movimentos com a cabeça (Head-Shakes): período em que o animal realizava movimentos horizontais abruptos com a cabeça.

1.3. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada em todos os experimentos comparando-se o grupo estimulado e manipulado com o grupo intacto, bem como o grupo estimulado com o grupo manipulado. Os resultados foram expressos por média \pm EPM (erro padrão da média) e comparados entre os grupos experimentais através de uma análise da variância (ANOVA) e posteriormente comparados pelo teste de Newman-Keuls. No caso de apenas 2 grupos experimentais, foi utilizado o teste-t de Student para amostras independentes. Em alguns casos (latência dos comportamentos, por exemplo) os resultados foram expressos por mediana (desvio interquartil) e comparados entre grupos experimentais através da análise da variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis, ou através do teste de Mann-Whitney, quando eram 2 grupos experimentais (Siegel, 1975). O nível de significância aceito foi sempre de $p < 0,05$.

2.RESULTADOS

2.1. Campo-aberto com o predador

a) Duração de Locomoção

As fêmeas dos grupos experimentais quando comparadas às intactas no mesmo período, mostraram um aumento da duração da locomoção nos 3 períodos analisados (período 1 (antes da presença do predador) = aumento de 0,7 vezes para manipuladas e estimuladas; período 2 (na presença do predador) = 3,1 e 2,8 vezes; período 3 (após a retirada do predador) = 12,0 e 9,0 vezes, manipuladas e estimuladas, respectivamente). Quando a comparação foi analisada dentro do mesmo grupo, porém em períodos diferentes, as fêmeas dos grupos experimentais tiveram uma diminuição deste comportamento (período 2 comparado ao período 1 = 1,0 e 0,9 vezes; manipuladas e estimuladas, respectivamente) (Fig. 1).

Nos machos, quando comparados os grupos experimentais ao grupo intacto, dentro do mesmo período, verificou-se que no período 1 os animais manipulados tiveram um aumento da duração de locomoção (1,0 vez), resultado não evidenciado nos machos do grupo estimulado aversivamente no período neonatal. Nos períodos 2 e 3 os grupos experimentais mostraram um aumento deste comportamento (3,0 e 2,9 vezes, manipulados e estimulados, respectivamente). Quando a comparação foi realizada dentro do mesmo grupo, mas em períodos diferentes, o grupo manipulado mostrou uma diminuição da locomoção comparando-se o período 2 com o 1 (1,3 vezes), o grupo estimulado

não mostrou diferença significativa. Na comparação do período 3 com o período 1 não houveram diferenças significantes (Fig. 1).

b) Duração da exploração da área de localização do predador

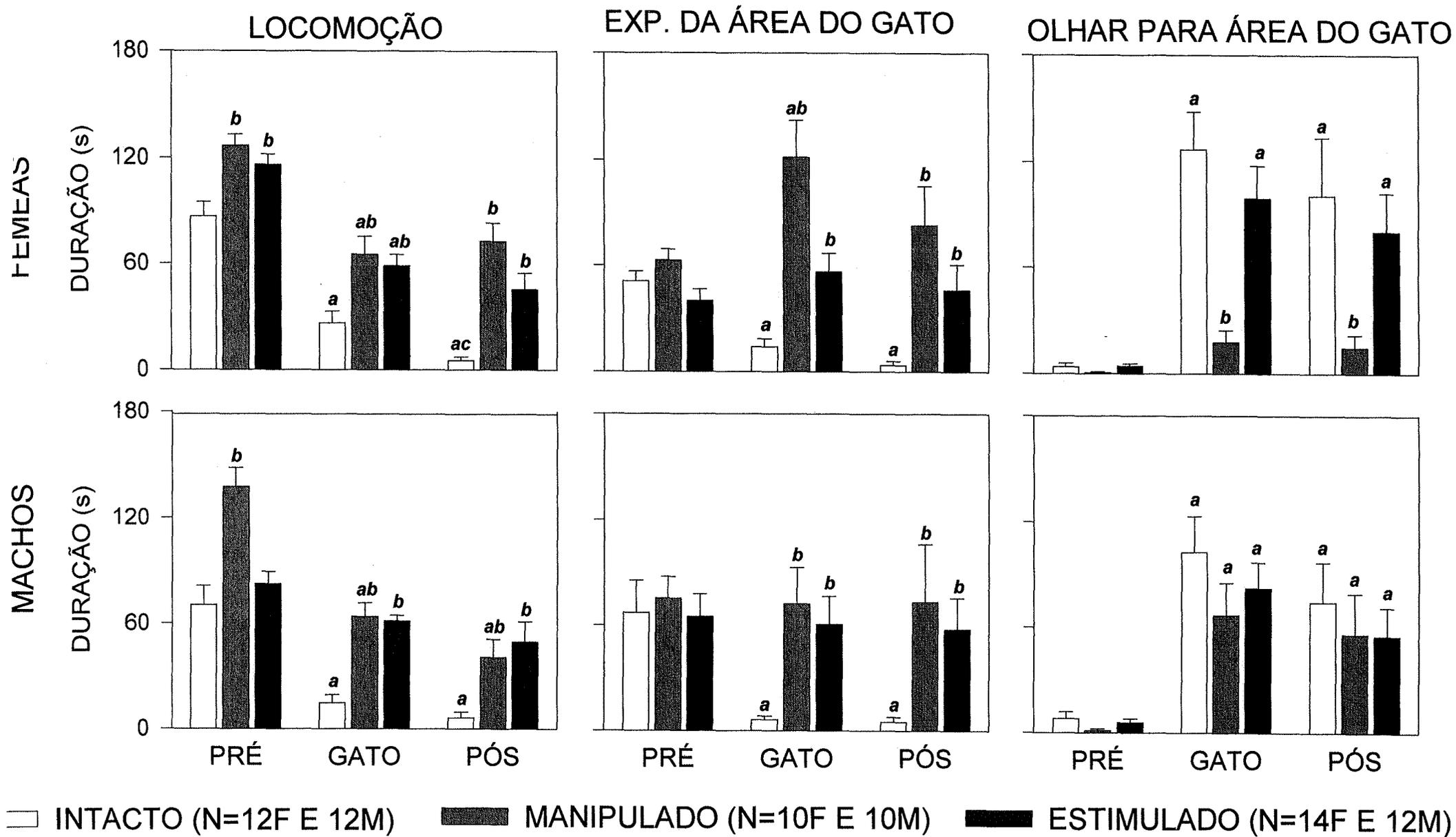
As fêmeas dos grupos experimentais (manipulados e estimulados aversivamente no período neonatal) comparadas as do grupo intacto no mesmo período não mostraram diferença deste comportamento no período 1. Nos períodos 2 e 3, as fêmeas experimentais mostraram um aumento da duração desse comportamento (período 2 = 10,0 e 4,0 vezes; período 3 = 8,0 e 3,0 vezes, manipuladas e estimuladas, respectivamente). Na comparação dentro do mesmo grupo em períodos diferentes, as fêmeas manipuladas mostraram um aumento da duração desse comportamento (período 2 comparado ao período 1 = 0,8 vezes), as fêmeas do grupo estimulado não mostraram diferenças significantes. Na comparação do período 3 com o período 1, as fêmeas dos grupos experimentais não mostraram diferenças significantes (Fig. 1).

Os machos dos grupos experimentais comparados aos intactos no mesmo período mostraram um aumento da duração desse comportamento no período 2 (3,0 e 2,9 vezes) e no período 3 (3,0 e 3,5 vezes, manipulados e estimulados, respectivamente), no período 1 apenas os animais manipulados mostraram um aumento significativo (1,0 vez). Quando a comparação foi realizada dentro do mesmo grupo em períodos diferentes não houveram diferenças significantes (Fig. 1).

c) Duração de esquadrihar (olhar para área do gato)

As fêmeas dos grupos experimentais comparadas as fêmeas do grupo intacto dentro do mesmo período não mostraram diferenças deste comportamento no período 1. No período 2 e 3 somente as fêmeas manipuladas diminuíram a duração desse comportamento (período 2 = 7,0; período 3 = 6,0 vezes). Comparando-se as fêmeas dentro do mesmo grupo em períodos diferentes, os resultados mostraram que as fêmeas manipuladas não são diferentes em nenhuma das comparações, porém as fêmeas estimuladas aumentaram a duração desse comportamento em ambas comparações (período 2 comparado ao 1 = 20,0; período 3 comparado ao 1 = 15,0 vezes) (Fig. 1). Os machos dos grupos experimentais não mostraram diferença do grupo intacto quando analisados no mesmo período. Quando os animais dos grupos experimentais foram comparados dentro do mesmo grupo, mas em períodos diferentes, mostraram um aumento da duração desse comportamento (período 2 comparado ao período 1 = 59,0 e 13,0 vezes; período 3 comparado ao 1 = 49,0 e 9,0 vezes, manipulados e estimulados, respectivamente) (Fig. 1).

Figura 1 – Efeito da estimulação neonatal sobre a duração dos comportamentos de locomoção, exploração da área do gato e olhar para área do gato, em machos e fêmeas na idade adulta, no teste de campo aberto com o predador. Dados expressos pela média \pm EPM.



^a P<0.05 comparado ao mesmo grupo no período pré-gato

^b P<0.05 comparado ao grupo intacto no mesmo período

^c P<0.05 comparado ao mesmo grupo no período com o gato

Figura 1- Efeito da Estimulação Neonatal sobre a duração dos comportamentos no campo-aberto com o predador em machos

comportamentos no campo-aberto com o predador em machos

comportamentos no campo-aberto com o predador em machos

2.2.Labirinto em cruz-elevado

a)Resultados dos comportamentos em fêmeas

As fêmeas dos grupos experimentais (manipuladas e estimuladas aversivamente no período neonatal) quando comparadas as fêmeas do grupo intacto mostraram um aumento na frequência de entradas no braço-fechado (aumento de 0,6 vezes tanto nas manipuladas quanto nas estimuladas), porém no braço-aberto, somente as estimuladas apresentaram um aumento significativo (0,8), resultando num aumento do total de entradas nos braços (0,6 e 0,7 vezes, manipuladas e estimuladas, respectivamente). As fêmeas manipuladas aumentaram a frequência do comportamento de cabeça para fora do braço aberto (0,9). Em relação a frequência de esquadrihar, duração no braço fechado e braço aberto, e aos índices PFBA e PTBA não houveram diferenças significantes entre os grupos (Tab. 1).

b)Resultados dos comportamentos em machos

Os machos dos grupos experimentais quando comparados aos intactos não mostraram diferenças significantes quanto a frequência no braço fechado, braço aberto, cabeça para fora do braço aberto e esquadrihar, bem como nos índices PFBA e PTBA, e na frequência total de entradas nos braços. Os machos manipulados mostraram uma diminuição na duração no braço fechado (0,2) e um

aumento da duração no braço aberto (0,8) quando comparados aos intactos (Tab. 1).

Tabela 1- Efeito da estimulação aversiva neonatal sobre a frequência e duração de comportamentos no labirinto em cruz elevado em machos e fêmeas adultos (70 dias de idade). Dados expressos como média \pm EPM.

COMPORTAMENTOS	SEXO	INTACTO	MANIPULADO	ESTIMULADO
FREQ. BRAÇO FECHADO	Fêmeas	3,1 \pm 0,2	5,1 \pm 0,5*	5,2 \pm 0,7*
	Machos	4,9 \pm 0,7	5,6 \pm 0,6	4,6 \pm 0,4
FREQ. BRAÇO ABERTO	Fêmeas	2,5 \pm 0,3	4,0 \pm 0,5	4,5 \pm 0,5*
	Machos	3,1 \pm 0,5	4,8 \pm 0,7	3,6 \pm 0,5
FREQ. CABEÇA FORA BRAÇO ABERTO	Fêmeas	7,1 \pm 1,2	13,3 \pm 1,5 *	9,4 \pm 1,5
	Machos	9,0 \pm 2,0	15,4 \pm 1,9	11,3 \pm 2,5
FREQ. ESQUADRINHAR	Fêmeas	11,0 \pm 1,5	9,4 \pm 1,2	7,8 \pm 1,2
	Machos	12,2 \pm 1,6	12,1 \pm 1,3	10,7 \pm 1,3
DUR. BRAÇO FECHADO (s)	Fêmeas	229,1 \pm 24,9	202,3 \pm 11,6	204,1 \pm 14,4
	Machos	233,8 \pm 11,7	191,4 \pm 14,9*	215,1 \pm 12,3
DUR. BRAÇO ABERTO (s)	Fêmeas	61,3 \pm 20,7	83,3 \pm 8,6	86,5 \pm 14,4
	Machos	54,0 \pm 9,2	96,5 \pm 13,4*	73,8 \pm 11,8
PFBA (%)	Fêmeas	4	4	5
	Machos	4	4	4
PTBA (%)	Fêmeas	2	3	3
	Machos	2	3	3
FREQ. TOT. ENTRADAS	Fêmeas	5,6 \pm 0,5	9,1 \pm 1,0	9,8 \pm 1,1
	Machos	8,0 \pm 1,0	10,4 \pm 1,3	8,2 \pm 0,6

* P<0,05 quando comparado ao grupo intacto

2.3. Comportamento Agressivo Maternal

Quando comparadas às fêmeas dos grupos experimentais com as do grupo intacto, não houveram diferenças significantes na duração e latência dos

comportamentos de investigar o intruso, de interação com os filhotes e de arrumar o ninho (Tab. 2 e 3), assim como na latência dos comportamentos de ataque frontal, de ataque lateral, de boxear, de morder e de postura agressiva (Tab. 3). Da mesma forma, a frequência dos comportamentos de arrumar o ninho (Tab 4), de investigação social e de ataque frontal (Fig. 2) também não foram significativamente diferentes. As fêmeas manipuladas mostraram um aumento na frequência dos comportamentos de interação com os filhotes (1,4), de ataque lateral (1,0) e de morder (1,3) (Tab. 4 e Fig. 2). As fêmeas estimuladas mostraram um aumento na frequência de boxear (comparadas ao grupo intacto = 1,9 e comparadas ao grupo manipulado = 3,7 vezes), de interação com os filhotes (comparadas ao grupo intacto = 1,9), de postura agressiva (comparadas ao grupo intacto = 1,8 e comparadas ao grupo manipulado = 3,0), de ataque lateral (comparadas ao grupo intacto = 1,8) e de morder (comparadas ao grupo intacto = 1,8) (Fig. 2).

Tabela 2- Efeito da estimulação neonatal sobre a duração dos comportamentos analisados no teste de comportamento agressivo maternal. Dados expressos como média \pm EPM.

COMPORTAMENTOS	INTACTO	MANIPULADO	ESTIMULADO
INVESTIGAR O INTRUSO	57,8 \pm 6,0	62,3 \pm 7,5	29,4 \pm 3,9
INTERAÇÃO COM OS FILHOTES	60,0 \pm 27,1	49,7 \pm 13,5	64,4 \pm 20,6
ARRUMAR O NINHO	8,0 \pm 4,1	40,2 \pm 20,0	11,2 \pm 6,0

Tabela 3- Efeito da estimulação neonatal sobre a latência dos comportamentos analisados no teste de comportamento agressivo maternal. Dados expressos como média \pm EPM.

COMPORTAMENTOS	INTACTO	MANIPULADO	ESTIMULADO
INVESTIGAR O INTRUSO	66,6 \pm 53,6	12,2 \pm 4,5	7,1 \pm 2,2
ATAQUE FRONTAL	384,1 \pm 72,3	243,4 \pm 49,3	173,0 \pm 60,0
ATAQUE LATERAL	82,4 \pm 17,7	108,2 \pm 36,4	26,3 \pm 7,4
BOXEAR	227,5 \pm 72,9	315,9 \pm 53,0	39,0 \pm 10,0
MORDER	151,9 \pm 50,0	91,0 \pm 30,0	27,5 \pm 8,4
INTERAÇÃO COM OS FILHOTES	251,0 \pm 80,4	74,6 \pm 30,5	92,2 \pm 57,5
POSTURA AGRESSIVA	69,3 \pm 16,3	190,8 \pm 42,0	39,0 \pm 9,9
ARRUMAR O NINHO	462,7 \pm 57,9	338,5 \pm 46,9	413,4 \pm 70,5

Tabela 4- Efeito da estimulação neonatal sobre a frequência do comportamento agressivo maternal. Dados expressos como média \pm EPM.

COMPORTAMENTOS	INTACTO	MANIPULADO	ESTIMULADO
BOXEAR	3,5 \pm 0,9	2,2 \pm 0,5	10,3 \pm 1,6 * #
INTERAÇÃO COM OS FILHOTES	2,3 \pm 0,8	5,6 \pm 0,9 *	6,6 \pm 1,1 *
POSTURA AGRESSIVA	8,4 \pm 1,8	6,0 \pm 1,2	23,8 \pm 4,8 * #
ARRUMAR O NINHO	3,5 \pm 1,6	7,7 \pm 1,8	4,6 \pm 1,9

* $p < 0,05$ comparado ao grupo intacto.

$p < 0,05$ comparado ao grupo manipulado.

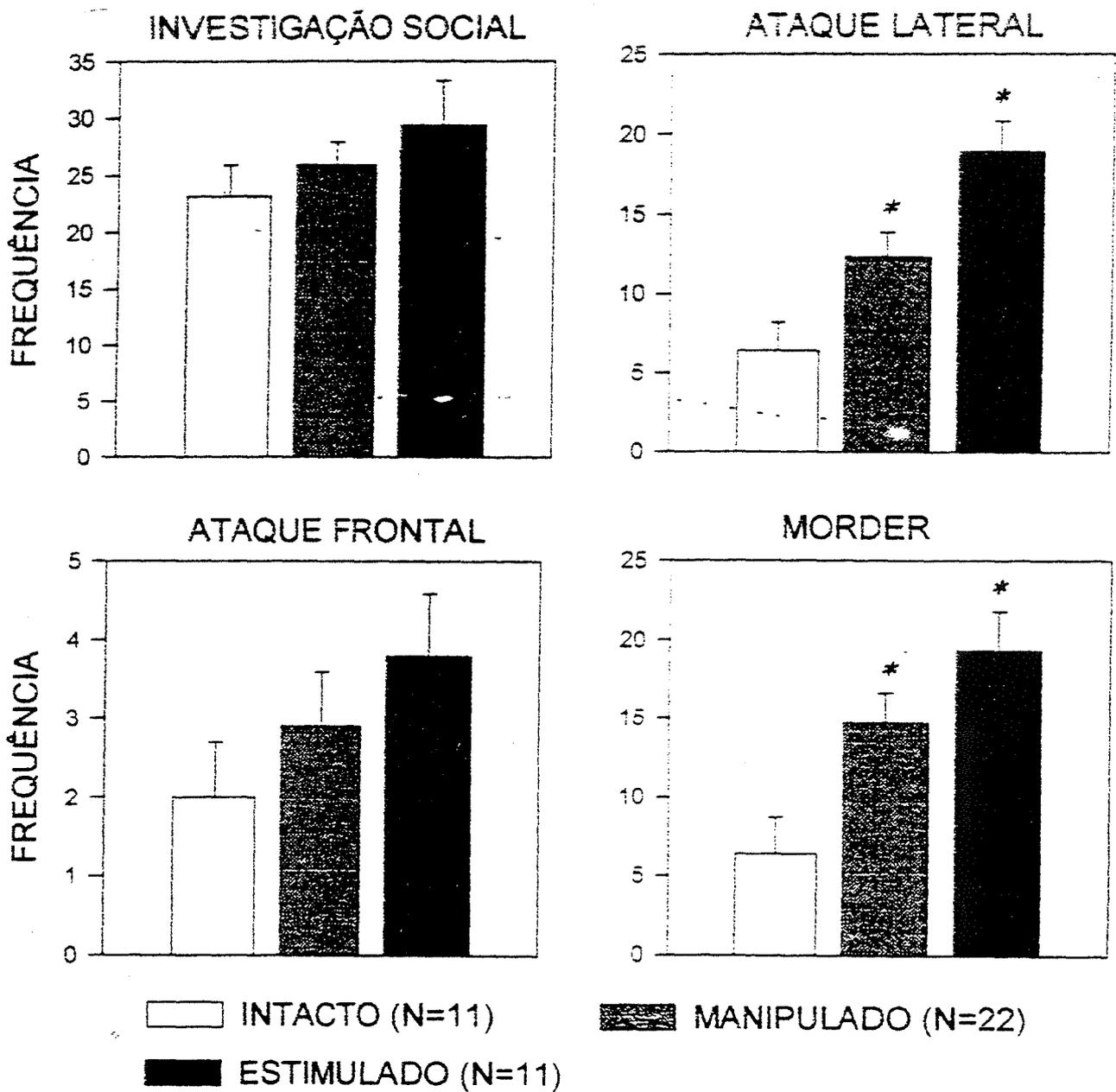


Figura 2- Efeito da Estimulação neonatal sobre o comportamento agressivo materno de fêmeas. Dados expressos pela média \pm EPM

2.4. Comportamento sexual de machos

a) Sem experiência sexual prévia

Os machos do grupo manipulado quando comparados aos do grupo intacto mostraram um aumento na latência dos comportamentos de cheirar genitais (0,5 vez), de monta (5,8 vezes) e de intromissão (12,1 vezes) (Tab. 5). Em relação a frequência, houve um aumento do comportamento de cheirar genitais (1,0 vez) e uma diminuição do comportamento de monta (2,0 vezes) (Tab.5) e do comportamento de intromissão (5,6 vezes) (Fig. 3). Quanto a duração, os machos manipulados mostraram uma diminuição do comportamento de cheirar genitais (2,1 vezes) (Fig. 3).

Os machos do grupo estimulado quando comparados aos dos grupos intacto e manipulado mostraram um aumento da latência de cheirar genitais (comparados aos intactos = 1,3 e comparados aos manipulados = 0,6 vez), de monta (comparados aos intactos = 42,0 e comparados aos manipulados = 5 vezes) e de intromissão (comparados aos intactos = 12,1 vezes, não houve diferença significativa quando comparados aos manipulados) (Tab. 5). Os animais estimulados mostraram uma diminuição na frequência dos comportamentos de monta (comparados aos intactos = 3,2 vezes, não foram significativamente diferentes do grupo manipulado) (Tab. 5) e de intromissão (comparados aos intactos = 7,0 vezes, não houve diferença quando comparados aos manipulados) (Fig. 3). Quanto a duração, os animais estimulados não foram diferentes dos intactos e dos manipulados (Fig. 3).

b) Com experiência sexual prévia

Os machos do grupo manipulado quando comparados aos do grupo intacto mostraram um aumento da frequência do comportamento de cheirar genitais (0,6 vez) (Tab. 5) e da latência de intromissão (2,5 vezes) (Fig. 3). A latência dos comportamentos de cheirar genitais e de monta; frequência de monta e de intromissão não foram significativamente diferentes daquelas do grupo intacto (Tab. 5 e Fig. 3). Os machos do grupo estimulado quando comparados aos grupos intacto e manipulado mostraram um aumento da latência de cheirar genitais (comparados aos intactos = 1,7 e comparados aos manipulados = 2,7 vezes) e de intromissão (comparados aos intactos = 12,0 vezes) (Tab. 5 e Fig. 3). Em relação a frequência, mostraram uma diminuição do comportamento de cheirar genitais (comparados aos intactos = 1,2 e comparados aos manipulados = 2,6 vezes), de monta (comparados aos manipulados = 2,3 vezes) e de intromissão (comparados aos intactos = 1,2 vez). Da mesma forma, mostraram uma diminuição da duração do comportamento de cheirar genitais (comparados aos intactos = 2,2 vezes) (Tab. 5 e Fig. 3).

Tabela 5- Efeito da manipulação e da estimulação aversiva no período neonatal sobre o comportamento sexual de machos com 70 dias de idade. O comportamento foi analisado em animais com e sem experiência sexual prévia. Dados expressos como média \pm EPM para frequências e mediana (intervalos interquartis) para latência.

COMPORTAMENTOS	EXPERIÊNCIA SEXUAL	INTACTO	MANIPULADO	ESTIMULADO
LAT. CHEIRAR GENITAIS	Sem exp.	36,0(12/73)	54,0(27/138)*	84,5(45/419)*#
	Com. exp.	14,0(8/42)	10,0(4/68)	37,5(10/261)*#
LAT. MONTA	Sem exp.	22,0(14/54)	150,0(117/900)*	900,0(150/900)*#
	Com. exp.	50,5(11/192)	40,0(24/145)	41,0(22/318)
LAT. INTROMISSÃO	Sem exp.	68,5(33/900)	900,0(900/900)*	900,0(900/900)*
FREQ. CHEIRAR GENITAIS	Sem exp.	5,3 \pm 0,8	10,5 \pm 3,0 *	4,1 \pm 1,0
	Com. exp.	14,3 \pm 1,7	23,6 \pm 6,5*	6,5 \pm 2,0 *#
FREQ. MONTA	Sem exp.	5,5 \pm 0,5	1,8 \pm 0,8*	1,3 \pm 0,7*
	Com. exp.	4,3 \pm 0,6	9,5 \pm 2,4	2,9 \pm 0,5#

* $p < 0,05$ comparado ao grupo intacto

$p < 0,05$ comparado ao grupo manipulado

Figura 3 – Efeito da estimulação neonatal sobre o comportamento sexual de machos com 70 dias de idade. Em cada grupo foi realizado uma análise dos machos sem experiência sexual prévia e com experiência sexual. Dados apresentados como média \pm EPM.

2.5. Habituação no campo aberto

Neste experimento foram analisados os parâmetros de frequência e duração dos comportamentos de locomoção e "rearing" em machos e fêmeas. Os resultados mostraram que não houveram diferenças significantes entre os grupos analisados em nenhum dos parâmetros e comportamentos acima citados, tanto em machos (Fig. 4, Tab. 6) quanto em fêmeas (Fig. 4, Tab. 7).

Tabela 6- Efeito da manipulação e estimulação aversiva no período neonatal sobre a frequência do comportamento de habituação no campo aberto de machos aos 70 dias de idade. Os comportamentos foram analisados durante 4 dias consecutivos. Dados expressos como média \pm EPM.

COMPORTAMENTOS	GRUPOS	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
LOCOMOÇÃO	Intacto	47,8 \pm 2,9	33,2 \pm 3,4	34,3 \pm 4,0	29,2 \pm 3,9
	Manipulado	40,4 \pm 5,4	31,4 \pm 4,6	30,0 \pm 3,5	32,5 \pm 5,7
	Estimulado	52,8 \pm 3,5	35,7 \pm 5,4	34,7 \pm 5,0	36,0 \pm 3,8
REARING	Intacto	20,2 \pm 1,2	13,1 \pm 1,2	10,5 \pm 1,3	10,3 \pm 1,3
	Manipulado	23,4 \pm 2,8	12,6 \pm 1,8	12,7 \pm 2,1	15,6 \pm 2,1
	Estimulado	23,0 \pm 1,8	15,9 \pm 2,7	15,0 \pm 2,7	15,0 \pm 2,2

Tabela 7- Efeito da manipulação e estimulação aversiva no período neonatal sobre a frequência do comportamento de habituação no campo aberto de fêmeas aos 70 dias de idade. Os comportamentos foram analisados durante 4 dias consecutivos.

Dados expressos como média \pm EPM.

COMPORTAMENTOS	GRUPOS	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
LOCOMOÇÃO	Intacto	36,9 \pm 4,7	37,8 \pm 6,3	31,9 \pm 6,2	24,7 \pm 3,6
	Manipulado	53,8 \pm 1,8	45,6 \pm 5,7	56,8 \pm 5,2	49,0 \pm 6,2
	Estimulado	52,1 \pm 3,9	38,8 \pm 4,3	29,1 \pm 5,1	27,6 \pm 2,9
REARING	Intacto	16,1 \pm 1,5	12,9 \pm 2,7	10,6 \pm 2,2	7,9 \pm 1,2
	Manipulado	26,8 \pm 3,5	21,4 \pm 2,9	23,6 \pm 1,9	17,6 \pm 2,0
	Estimulado	23,5 \pm 2,1	18,4 \pm 2,5	10,8 \pm 2,2	11,6 \pm 1,9

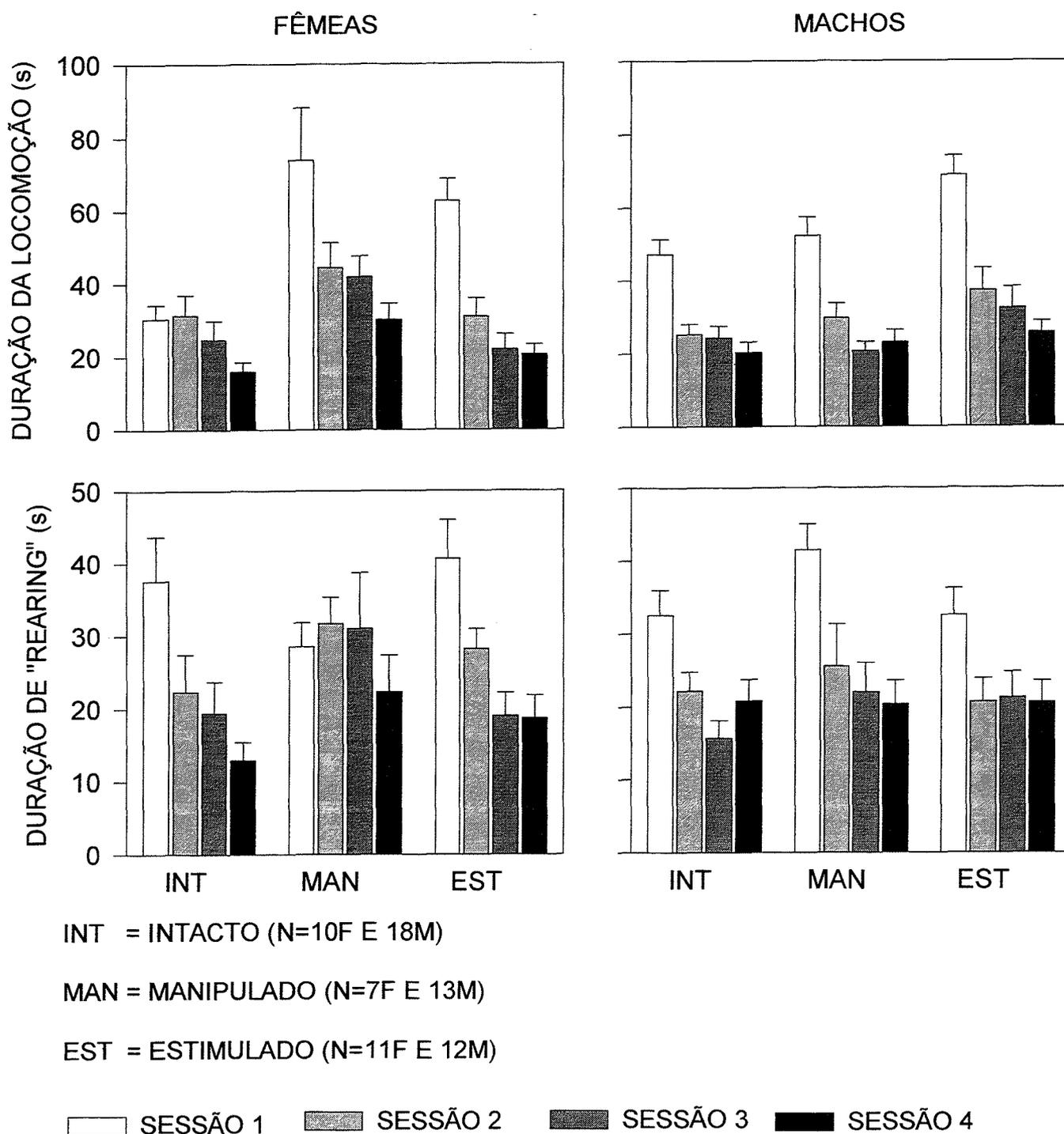


Figura 4- Efeito da Estimulação Neonatal sobre o comportamento de habituação no campo-aberto em machos e fêmeas adultos. O teste foi realizado em 4 dias consecutivos (sessões 1, 2, 3 e 4). Dados expressos pela média \pm EPM.

2.6. Labirinto aquático de Morris (teste de memória espacial)

Neste experimento foram analisados os parâmetros de frequência de passagens pelo local onde estava a plataforma no dia do treinamento (teste) e de duração da permanência do animal nos quadrantes 1, 2, 3 e 4. Os resultados mostraram que tanto machos quanto fêmeas dos grupos experimentais não foram diferentes do grupo intacto em nenhum dos parâmetros citados acima (Tab. 8).

Tabela 8-Efeito da manipulação e estimulação aversiva no período neonatal sobre o comportamento de natação no labirinto aquático de Morris em machos e fêmeas aos 70 dias de idade. Dados expressos como média \pm EPM.

COMPORTAMENTOS	SEXO	INTACTO	MANIPULADO	ESTIMULADO
FREQ.NO LOCAL DA PLATAFORMA	Fêmeas	3,3 \pm 0,6	2,2 \pm 0,8	3,5 \pm 0,7
	Machos	2,6 \pm 1,4	3,8 \pm 1,8	2,5 \pm 1,7
DUR. QUAD. 1 (s)	Fêmeas	28,8 \pm 2,3	31,0 \pm 2,6	3,5 \pm 0,7
	Machos	30,0 \pm 8,1	30,4 \pm 10,4	26,3 \pm 9,6
DUR. QUAD. 2 (s)	Fêmeas	34,1 \pm 2,3	32,4 \pm 2,6	36,0 \pm 3,2
	Machos	36,0 \pm 10,6	35,2 \pm 9,1	35,8 \pm 10,1
DUR. QUAD. 3 (s)	Fêmeas	34,0 \pm 2,5	27,6 \pm 2,7	35,2 \pm 2,0
	Machos	28,4 \pm 5,8	33,0 \pm 7,6	30,9 \pm 12,2
DUR. QUAD. 4(s)	Fêmeas	23,3 \pm 1,6	28,6 \pm 4,2	25,2 \pm 2,5
	Machos	26,7 \pm 8,6	22,2 \pm 4,1	27,0 \pm 6,7

2.7. Teste de nado-forçado

Neste experimento foi analisado o parâmetro de duração dos comportamentos de mobilidade, de imobilidade e de mexer com a cabeça “head-shaque” no teste de nado-forçado, no dia 1 e 2. Os resultados mostraram que em ambos os dias analisados (teste e reteste) tanto machos quanto fêmeas dos grupos experimentais não foram diferentes do grupo intacto quanto a duração dos comportamentos citados acima (Tab. 9).

Tabela 9-Efeito da manipulação e estimulação aversiva no período neonatal sobre a duração dos comportamentos no teste de nado-forçado, em machos e fêmeas aos 70 dias de idade, analisados no dia 1 (teste) e 2 (reteste). Dados expressos como média \pm EPM.

DUR. MOB. (s)	TESTE FÊMEAS	TESTE MACHOS	RETESTE FÊMEAS	RETESTE MACHOS
Intacto	183,8 \pm 20,7	221,8 \pm 21,2	160,5 \pm 23,7	140,8 \pm 17,4
Manipulado	191,0 \pm 15,7	249,8 \pm 41,0	142,8 \pm 15,4	131,8 \pm 20,2
Estimulado	197,8 \pm 31,3	194,5 \pm 21,9	199,8 \pm 13,0	115,6 \pm 14,1
DUR. IMOB. (s)				
Intacto	728,1 \pm 18,2	679,2 \pm 21,2	139,5 \pm 23,7	159,3 \pm 17,6
Manipulado	698,4 \pm 18,7	651,1 \pm 41,2	157,2 \pm 15,4	168,2 \pm 20,2
Estimulado	701,2 \pm 28,3	706,3 \pm 21,8	100,2 \pm 13,0	184,2 \pm 14,1
DUR. MEXER COM A CABEÇA (s)				
Intacto	81,8 \pm 9,2	64,9 \pm 9,7	38,5 \pm 4,8	30,4 \pm 5,8
Manipulado	59,0 \pm 9,6	70,3 \pm 8,8	35,1 \pm 6,5	35,7 \pm 4,1
Estimulado	49,4 \pm 6,5	68,1 \pm 7,0	39,6 \pm 4,1	33,3 \pm 4,6

3.DISSCUSSÃO

Este trabalho utilizou vários testes comportamentais, padronizados em nosso laboratório, para analisar os efeitos da manipulação ou da estimulação aversiva no período pós-parto sobre a fase adulta.

3.1.Campo-aberto com o predador

Os resultados mostraram que a manipulação no período neonatal ou a estimulação aversiva diminuem a inibição comportamental em ratos machos e fêmeas adultos quando avaliados em situações ou ambientes novos ou potencialmente prejudiciais como, por exemplo, no teste de campo aberto com um predador. As avaliações comportamentais no campo aberto com o predador mostraram um aumento da locomoção dos ratos dos grupos experimentais, tanto em relação à frequência quanto à duração. Esse resultado está de acordo com estudos prévios (Levine et al., 1967) que relataram uma hiperatividade dos animais estimulados nesse período em testes de campo aberto.

São bem descritos na literatura, uma diminuição do medo a ambientes novos em animais manipulados no período neonatal. Os efeitos foram mesurados pelo aumento da locomoção e diminuição de bolos fecais no campo-aberto (Denenberg, 1964; Denenberg, 1969; Hess et al., 1969; Denenberg et al., 1973; Smythe et al., 1994), assim como, uma menor responsividade dos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal a eventos estressantes na vida adulta (Levine et al., 1967; Meaney et al., 1993). O dado diferenciado do presente trabalho é a diminuição do medo, não só ao ambiente novo bem como frente ao predador. Neste modelo, ratos intactos apresentam diminuição da locomoção, bem como de

todos os outros comportamentos avaliados, como esquadrinhar e “rearing”. Esse padrão de resposta da presa (rato) frente a um predador (gato) é esperado. Os animais que foram manipulados ou estimulados aversivamente no período neonatal apresentavam um conjunto de respostas comportamentais inadequado ao ambiente aversivo. Os animais dos grupos experimentais tem uma diminuição do medo como mostra o resultado de estar na área do gato, gerando uma grande exposição ao predador natural. Pode-se discutir se esta diminuição do medo frente ao predador foi gerada devido ao aumento da atividade geral do rato no campo aberto ou pela diminuição do medo “per se”. Ao analisar detalhadamente os dados que geram a conclusão da diminuição do medo, podemos notar que o animal apresenta padrão comportamental que parece ignorar o predador. O rato percorre todo o campo-aberto inclusive o local que está ou esteve o gato, como se fosse apenas mais um local a ser explorado, mostrando um baixo grau de interação com o meio e com o predador. Mesmo quando o predador emitia sons, e obviamente o rato também podia sentir o seu cheiro e ver sua movimentação na gaiola, o rato permanecia alheio não demonstrando reação de sobressalto ou congelamento como seria de se esperar e como foi constatado no grupo controle (intacto). Aqui nos parece já seriam três questões a serem consideradas, hiperatividade, diminuição do medo e diminuição de interação com o meio que o cerca e conseqüentemente com os estímulos ambientais. Do teste do campo aberto com o predador, uma conclusão precisa que pode ser tirada é o aumento da atividade geral do animal, em relação ao medo parece haver uma diminuição. No entanto, se a diminuição do medo é causada pela hiperatividade ou por uma redução da interação com o ambiente ainda precisa ser esclarecida.

3.2.Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado é um teste muito utilizado para avaliação de ansiedade e do medo (Lucion et al., 1996). Nossos resultados mostraram que o animal manipulado ou estimulado aversivamente no período neonatal aumenta tanto a frequência de entradas nos braços fechados quanto a frequência de entradas nos braços abertos. O aumento da frequência de entradas em ambos os braços evidencia um aumento da atividade locomotora geral do animal no labirinto. Este resultado corrobora o encontrado no campo aberto com o predador.

Núñez (1995), observou um aumento significativo do número de entradas nos braços abertos em ratas que foram manipuladas diariamente, durante 15 minutos, do nascimento ao desmame. Obtendo resultados similares ao de Núñez (1995), McIntosh et al. (1999), concluíram que o procedimento de separação materna diminui a emocionalidade em ratas fêmeas. Nossos resultados, são semelhantes em relação ao aumento da frequência no braço aberto, porém como comentado anteriormente, deve estar relacionado a hiperatividade devido ter aumentado também a frequência no braço fechado.

A conclusão dos resultados obtidos no teste de labirinto em cruz elevado é de que a estimulação no período neonatal não produz efeitos sobre o medo/ansiedade, pois os comportamentos que evidenciam alterações como aumento da frequência no braço aberto sem aumentar a frequência no braço fechado expresso pela porcentagem de frequência de entradas e pelo maior tempo de permanência nos braços abertos (porcentagem de tempo no braço aberto) e pelo aumento da frequência da cabeça para fora do braço aberto não foram observados. Com os resultados obtidos no labirinto pode-se ter uma visão

melhor do aspecto citado anteriormente no teste do campo aberto em relação a diminuição do medo. Devido ao animal ter aumentado apenas a frequência total de entradas nos braços abertos e fechado continua evidenciado a hiperatividade e a baixa interação com o ambiente, pois o aumento da atividade locomotora foi inespecífica, locomovendo-se em ambos os braços demonstrando baixa interação com o ambiente em torno do labirinto. Assim, parece não ter havido alteração do medo. No teste do labirinto em cruz elevado, assim como no do campo-aberto com o predador, o animal manipulado ou estimulado aversivamente no período neonatal parece estar alheio ao ambiente que o cerca, particularmente em relação a situações de perigo.

A discussão em relação a diminuição do medo em animais manipulados no período neonatal nos parece importante visto que este resultado é descrito por vários autores (Denenberg & Smith, 1963; Denelsky & Denenberg, 1967; Levine et al., 1967). Os dois testes comportamentais para avaliar medo/ansiedade utilizados no presente trabalho nos levam à conclusão de que os animais manipulados ou estimulados aversivamente no período neonatal parecem interpretar de maneira inadequada estímulos ambientais. Também concluiu-se que ocorre uma diminuição do medo que consideramos prejudicial ao animal, pois podem colocar em risco sua integridade física.

3.3. Comportamento Agressivo Maternal

Outro comportamento analisado neste experimento foi a agressividade contra machos intrusos de fêmeas lactantes que foram manipuladas ou estimuladas aversivamente quando jovens. Os resultados mostraram um aumento da frequência de cheirar o intruso, ataque lateral, ataque frontal e morder. Quando o intruso era colocado na caixa, a fêmea imediatamente iniciava a investigação, atacando-o logo a seguir. Além do aumento dos dois tipos de ataque (frontal e lateral), um dado interessante foi o grande aumento do número de mordidas, diferentemente das fêmeas intactas. A natureza do comportamento agressivo da fêmea lactante é defensiva (proteção da área do ninho e dos filhotes), ela executa alguns ataques iniciais e após o intruso estar em posição de congelamento, ela permanece no ninho, observando as possíveis movimentações do mesmo. Nas fêmeas manipuladas ou estimuladas aversivamente no período neonatal o que se observou na maioria dos casos foi um ataque contínuo, mesmo após o intruso se encontrar imóvel no canto oposto da caixa. O congelamento do intruso é o estímulo natural para que os ataques da fêmea cessem, mas aparentemente as ratas dos grupos experimentais ignoraram ou não foram capazes de interpretar corretamente este estímulo, pois continuam a atacar o macho intruso principalmente com mordidas isoladas, sem estarem associadas aos outros comportamentos do padrão agressivo (postura agressiva e ataque lateral). Este dado mostra que a fêmea lactante que foi manipulada ou estimulada aversivamente no período neonatal deixa de apresentar o seu comportamento normal de luta, passando a ter um padrão estereotipado, que como foi mostrado pelas fêmeas intactas deste teste e em experimentos com machos manipulados

neonatal não é um padrão detectado em ratos Wistar (Hilakivi-Clarke et al., 1991). O que confirma esta consideração é o fato das fêmeas dos grupos experimentais utilizarem toda a caixa para a luta, inclusive por cima do ninho onde estão os filhotes, muitas vezes espalhando o ninho, o que descaracterizaria o comportamento como defensivo dos filhotes.

O aumento do número de mordidas ao intruso poderia ser interpretado como uma diminuição do medo, no entanto, o aumento do comportamento de contato corporal entre a fêmea e o macho intruso pode expor a fêmea a um ataque do seu oponente. Gerando conseqüências prejudiciais a fêmea como uma diminuição da capacidade de reprodução e conseqüentemente de perpetuação da espécie, que são efeitos deletérios cruciais da estimulação neonatal. Aqui novamente se coloca a discussão sobre a capacidade de interpretação adequada dos estímulos ambientais, que parece ser afetada pela estimulação neonatal.

3.4. Comportamento Sexual de Machos

O teste de comportamento sexual de machos que foram manipulados ou estimulados aversivamente no período neonatal foi dividido em dois períodos. Inicialmente os ratos foram analisados sem experiência sexual prévia (virgens) e posteriormente colocados com fêmeas para adquirirem experiência sexual. Quando animais intactos são colocados pela primeira vez com fêmeas o desempenho sexual é menos eficiente do que um macho sexualmente experiente. No início do teste, o que acontece normalmente são montas e intromissões imperfeitas, onde o animal não consegue segurar a fêmea de maneira correta para a penetração, mas posteriormente a performance melhora. Nos animais

manipulados ou estimulados aversivamente no período neonatal sem experiência sexual ocorreu uma diminuição importante do interesse pela fêmea, demonstrado por uma baixa, e em alguns animais até nula, frequência de monta e intromissão. Nesta situação, mesmo os animais que realizaram alguma monta ou intromissão durante o teste mostraram uma latência para a realização desses comportamentos muito maior do que a dos animais intactos. Por outro lado, a duração do cheirar genitais foi maior do que a dos intactos, dado esse que usualmente em conjunto com o comportamento de monta indica uma motivação do animal pela fêmea. Porém esse resultado ocorreu de maneira isolada, pois a frequência e latência de monta diminuíram. Portanto não seria correto dizermos que houve um aumento da motivação sexual analisando o dado de aumento de cheirar genitais isoladamente. Com isso conclui-se que os animais sexualmente inexperientes, manipulados ou estimulados aversivamente no período neonatal, apresentam uma diminuição do comportamento sexual. Os resultados desse teste em animais inexperientes reforçam a hipótese de que a estimulação neonatal diminui a capacidade de responder adequadamente aos estímulos ambientais e de interagir com o meio, no caso a fêmea receptiva.

Quando os ratos manipulados ou estimulados aversivamente no período neonatal foram analisados após adquirirem experiência sexual mostraram uma recuperação parcial do comportamento sexual, principalmente nos animais manipulados. Os resultados evidenciaram que os animais manipulados na maioria dos comportamentos analisados não foram diferentes dos animais intactos, como mostram os resultados da frequência de cheirar genitais e intromissão. Porém o comportamento sexual não foi recuperado totalmente, visto que a latência de

intromissão (tempo desde o início do experimento até a realização da primeira intromissão) continua alta em relação aos animais intactos, indicando que mesmo com a experiência sexual alguns comportamentos permanecem deficitários. Os animais estimulados com experiência sexual aumentaram suas médias de todos os comportamentos, porém comparados aos intactos e manipulados mantiveram um baixo desempenho sexual, o que já era esperado, pois na análise do comportamento em animais inexperientes o comportamento dos manipulados era baixo porém o dos estimulados aversivamente era ainda mais baixo.

Estudos anteriores mostraram que ratos machos que sofreram estimulação pré-natal tiveram uma diminuição do comportamento sexual quando adultos (Ward, 1972; Ward et al., 1994) porém esses resultados não se repetiram quando os mesmos foram manipulados no período neonatal e analisados quando adultos (Ward, 1972). Os nossos resultados estão de acordo com o trabalho de Ward (1972), no que se refere a animais manipulados com experiência sexual prévia. O experimento de Ward (1972) avaliou a performance sexual de machos que foram expostos a fêmea receptiva durante 6 dias consecutivos antes do teste, portanto os animais eram sexualmente experientes. Certamente os dados mais expressivos deste teste são os que levam a conclusão que animais que sofreram manipulação ou estimulação aversiva no período neonatal mostram uma diminuição do comportamento sexual quando comparados aos animais intactos, e que a experiência sexual pode parcialmente reverter os efeitos da manipulação ou estimulação aversiva no período neonatal. Esse resultado de recuperação do comportamento através da repetição e treinamento é importante porque pode provocar uma mudança na linha de estudos sobre as alterações provocadas por

distúrbios na fase neonatal. Pois a maioria das publicações teve suas conclusões sobre os efeitos da estimulação neonatal sobre o comportamento, baseadas em analisar os animais em apenas uma sessão teste, e com o resultado do comportamento sexual muitas conclusões poderão ser revistas com a realização de testes com repetições.

3.5. Habituação no campo aberto e Labirinto aquático de Morris (aprendizagem e memória)

O teste de habituação no campo-aberto foi realizado para verificar se o animal manipulado ou estimulado aversivamente no período neonatal tinha a capacidade de memorizar o local onde ele esteve no dia anterior e isso conseqüentemente diminuiu a atividade exploratória. Os resultados indicam que os animais dos grupos experimentais comportam-se da mesma maneira que os animais intactos em relação a habituação analisada durante 4 dias consecutivos. Todos os grupos mostraram um decréscimo das atividades exploratórias ao longo dos dias experimentais, porém os grupos experimentais mantiveram valores mais altos nas freqüências dos comportamentos exploratórios, principalmente locomoção. Tucker & Johnson (1984), em um estudo semelhante analisaram a orientação e a quantidade de bolos fecais no campo aberto durante 5 dias consecutivos em animais adultos que foram manipulados neonatal e verificaram que os mesmos não são diferentes dos intactos. No entanto, em outro estudo de habituação no campo-aberto mostrou-se que ocorre uma diminuição dos bolos fecais e aumento das respostas de orientação em animais manipulados neonatal quando comparados a animais intactos (Rebouças & Schmidek, 1997). Nossos

resultados, concordam com os dados obtidos por Tucker e Johnson (1984), apesar de não ter sido analisado em nosso experimento o número de bolos fecais. Assim, os animais manipulados ou estimulados aversivamente no período neonatal se habituam num ambiente novo, entretanto mantém a hiperatividade. Este teste concluiu que a manipulação ou estimulação aversiva no período neonatal não afeta a habituação ao ambiente.

O outro teste realizado foi o labirinto aquático de Morris, utilizado para verificar a memória espacial dos animais. Os resultados tanto no dia 1 (teste) quanto no dia 2 (reteste) evidenciaram que os animais manipulados ou estimulados aversivamente no período neonatal não possuem diferenças significativas quando comparados aos animais intactos. No dia 1, todos os animais tiveram uma diminuição do tempo para encontrar a plataforma ao longo dos 8 treinamentos realizados. No dia 2, os animais dos grupos experimentais também não foram diferentes dos intactos em relação à frequência de passagem no local onde se encontrava a plataforma no dia anterior. Portanto esses dois testes (habituação no campo-aberto e labirinto aquático de Morris) nos levam a conclusão que a manipulação ou estimulação aversiva no período neonatal não provocam alterações na capacidade de aprendizagem e de memória espacial.

3.6. Nado-forçado

O teste de nado forçado foi realizado para verificar se o estresse neonatal pode induzir na adolescência um estado de desamparo aprendido-depressão (Maier & Seligman, 1976; Anisman & Zacharko, 1993). Devido a sequência imprevisível dos estímulos aversivos a que os filhotes foram submetidos, poder-

se-ia pensar que estes estímulos estariam afetando permanentemente circuitos neurais e subjacentes à depressão. Trabalhos prévios (Hilakivi-Clarke et al., 1991; Tejedor et al., 1998) mostraram que animais manipulados neonatal quando comparados a animais intactos não mostram diferenças no teste de nado forçado, porém quando os animais manipulados são submetidos a um estresse na idade adulta e testados neste teste, os animais manipulados foram menos reativos emocionalmente e também menos susceptíveis a ansiedade na adolescência quando comparados aos intactos (Gonzalez et al., 1990). Consideramos a hipótese de que submeter os filhotes a um procedimento de estimulação aversiva imprevisível poderia induzir a um estado de desamparo aprendido no animal adulto, gerando alterações do comportamento no teste de nado forçado. Mas contrariando esta hipótese, os resultados em animais estimulados aversivamente no período neonatal concordaram com os encontrados para os animais manipulados, os resultados do nado forçado tanto no dia do teste quanto no reteste não mostraram diferenças significantes entre os animais dos grupos experimentais e os intactos. Portanto, a estimulação aversiva da mesma maneira que a manipulação no período neonatal não gera um estado de depressão no animal.

3.7. Comparação entre os grupos experimentais

Uma outra discussão que deve ser realizada é entre os dois grupos experimentais. Quando comparados os dois grupos experimentais (manipulados e estimulados aversivamente no período neonatal) na maioria dos testes realizados

acima, as conseqüências comportamentais tanto da manipulação quanto da estimulação aversiva na fase adulta mostraram apenas uma pequena diferença entre os dois grupos experimentais. Isto nos levou a conclusão que as alterações induzidas pela estimulação aversiva no período neonatal e pela manipulação no desenvolvimento do cérebro não são essencialmente diferentes, independente da natureza ou do procedimento de estimulação neonatal. De fato, tem sido argumentado que a reação da mãe (aumento dos cuidados maternos) em resposta ao distúrbio realizado nos filhotes neste período possa ser a causa primária das alterações comportamentais nos animais adultos estimulados neonatalmente e não o procedimento experimental por si só (Levine 1994; Liu et al., 1997; Sapolsky, 1997).

Porém em alguns testes como o do comportamento sexual a resposta dos animais manipulados e estimulados aversivamente no período neonatal é diferente, o que nos leva a concluir que a estimulação possa ativar uma maior quantidade de locais no sistema nervoso ou de vias que podem interferir em respostas mais complexas do animal.

Quando analisados conjuntamente os efeitos da estimulação neonatal na atividade no campo-aberto com predador, comportamento agressivo maternal e atividade sexual podemos concluir que a estimulação neonatal (tanto estimulação aversiva quanto manipulação) pode induzir efeitos diferentes no mecanismo de diferenciação neural relacionados aos vários comportamentos. O que é muito provável de ter acontecido devido a estimulação do animal ter ocorrido no período de intensa diferenciação do cérebro e provavelmente afetou uma larga variedade de funções cerebrais. Cotman et al., 1994, colocam que mudanças observadas na

estrutura e na função do SNC ao nível celular fornece uma plasticidade comportamental do cérebro. Alguns autores colocam que o melhor estímulo para a plasticidade cerebral é a experiência e, dependendo da intensidade ou do tipo da estimulação, produz várias mudanças cerebrais como, por exemplo, aumento no comprimento dos dendritos e alterações da atividade metabólica. Essas mudanças estão relacionadas a diferenças comportamentais entre os indivíduos e podem ser afetadas por fatores como a idade, hormônios gonadais e estresse (Zilles, 1992; Kolb, & Whishaw, 1998). Outra afirmação de vários autores é o fato de que as alterações no desenvolvimento do comportamento do animal submetido a estimulação neonatal parece ser devido ao fato do distúrbio da relação mãe-filhote (Levine, 1994; de Kloet et al., 1996; Liu et al., 1997),

Alternativamente, supõe-se que a estimulação neonatal gera distúrbios na relação mãe-filhote e isso induziria a uma alteração primária do cérebro e dos substratos neurais dos comportamentos.

CAPÍTULO 2

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE
COMPORTAMENTOS DE RATOS NO PERÍODO PERIPUBERAL
(33-35 DIAS DE IDADE)**

CAPÍTULO 2

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE COMPORTAMENTOS DE RATOS NO PERÍODO PERIPUBERAL (33-35 DIAS DE IDADE)

Objetivos específicos Este trabalho analisou as alterações comportamentais em animais durante o período peripuberal (33-35 dias de idade) geradas pela estimulação neonatal. Os animais foram estimulados no período neonatal (1^o ao 10^o dia) e posteriormente testados no campo aberto com predador e no labirinto em cruz elevado.

1.MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Animais

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da variedade Wistar provenientes dos biotérios do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Os animais foram estudados entre 33 e 35 dias de idade, divididos nos seguintes grupos experimentais :

a) Grupo I - INTACTO - animais que não foram manipulados pelo experimentador nem/ou pelos tratadores durante todo período de amamentação;

b) Grupo II - MANIPULAÇÃO - animais foram gentilmente manipulados pelo experimentador por 1 min uma vez por dia durante os 10 primeiros dias de vida;

c) Grupo III- ESTIMULADOS - animais que foram submetidos a estimulação aversiva pelo experimentador por 10 min uma vez por dia durante os 10 primeiros dias de vida.

No 7^o dia antes do parto, as fêmeas grávidas foram colocadas em caixas individuais. O dia do nascimento (dia 0) foi controlado rigorosamente e a ninhada padronizada em 8 filhotes por mãe. No dia seguinte ao nascimento dos filhotes, foi iniciado o procedimento de manipulação ou estimulação aversiva. Logo após cada sessão de manipulação ou estimulação aversiva os filhotes retornaram para a

caixa com a mãe. Depois desse período de estimulação neonatal, os ratos permaneceram com a mãe até o desmame (21 dias pós-parto) quando foram separados e mantidos em caixas (41x34x17cm) com animais do mesmo sexo e idade (de 2-5 animais por caixa) e tratados segundo a rotina padrão do biotério. Cada grupo experimental era formado por animais não pertencentes à mesma ninhada (não-irmãos). Todos os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas (período claro das 4:00 as 16:00 hs). A temperatura foi mantida constante em torno de 22^o C. Os animais tinham livre acesso à água e a ração específica para roedores (Nutrilab, Brasil) durante todo o experimento.

1.2. Metodologia da Estimulação Aversiva

A estimulação aversiva do experimento 2 foi realizada da mesma maneira que a do capítulo 1 (item 1.2).

1.3. Registro dos comportamentos

1.3.1. Campo-aberto com um predador

Foram analisados animais pré-puberes machos e fêmeas dos grupos intacto (N=14 machos e 9 fêmeas), manipulados (N= 10 machos e 9 fêmeas) e estimulados (N=10 machos e 9 fêmeas).

Os comportamentos analisados foram frequência e duração de locomoção, explorar a área do predador, esquadrihar. A metodologia experimental utilizada foi a mesma do capítulo 1 (item 1.3.1).

1.3.2. Labirinto em cruz elevado

Foram analisados animais pré-puberes (33-35 dias de idade), ratos machos e fêmeas divididos nos grupos intacto (N=8 fêmeas e 10 machos), manipulados (N=6 fêmeas e 7 machos) e estimulados (N= 9 fêmeas e 11 machos).

Os comportamentos analisados foram frequência e duração no braço aberto, braço fechado, cabeça para fora do braço aberto e esquadrinhar. Também foram analisados os índices de porcentagem de vezes que o animal entra no braço aberto, porcentagem de tempo que o animal permanece no braço aberto e a frequência total de entradas nos braços. A metodologia experimental utilizada foi a mesma do capítulo 1 (item 1.3.3).

1.4. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada comparando-se o grupo estimulado e manipulado ao grupo intacto, bem como o grupo estimulado ao grupo manipulado. Os resultados foram expressos por média (\pm EPM) e comparados entre os grupos experimentais através de uma análise da variância (ANOVA) e posteriormente comparados pelo teste de Newman-Keuls. Em alguns casos (latência dos comportamentos, por exemplo) os resultados foram expressos por mediana (desvio interquartil) e comparados entre grupos experimentais através da análise da variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis (Siegel, 1975). O nível de significância aceito foi sempre de $p < 0,05$.

2. RESULTADOS

2.1. Campo-aberto com o predador:

a) Duração da Locomoção

As fêmeas dos grupos experimentais quando comparadas às intactas no mesmo período, não mostraram diferenças significativas na duração da locomoção nos períodos 1, 2 e 3 (período 1 - antes da presença do predador, período 2 - na presença do predador e período 3 - após a retirada do predador) (Fig. 5). Quando as fêmeas dos grupos experimentais foram comparadas com o

próprio grupo, porém em períodos diferentes, mostraram uma diminuição na duração desse comportamento (período 2 comparado ao período 1 = 89,0 e 25,0, período 3 comparado ao período 1 = 79,0 e 20,0 vezes, manipuladas e estimuladas, respectivamente). Nos machos, quando comparados os grupos experimentais com o grupo intacto, dentro do mesmo período, os mesmos não mostraram diferença significativa nos períodos 1 e 2. No período 3, os animais dos grupos experimentais mostraram uma diminuição da duração de locomoção comparados aos intactos (aumento de 10,0 vezes tanto para manipulados quanto para estimulados). Quando a comparação foi realizada dentro do mesmo grupo em períodos diferentes, os animais dos grupos experimentais mostraram uma diminuição da duração desse comportamento (período 2 comparado ao 1 = 39,0 e 15,4; período 3 comparado ao 1 = 38,3 e 38,3 vezes, manipulados e estimulados, respectivamente) (Fig. 5).

b) Duração da exploração da área de localização do predador

As fêmeas dos grupos experimentais, no mesmo período, não mostraram diferenças significantes, quando comparadas as do grupo intacto (Fig. 5). Quando as fêmeas dos grupos experimentais foram comparadas dentro do próprio grupo, mas em períodos diferentes, mostraram uma diminuição da duração desse comportamento (período 2 comparado ao período 1 = 40,0 e 30,0 vezes; no período 3 comparado ao período 1 = 35,0 e 30,0 vezes, manipuladas e estimuladas, respectivamente). Os machos do grupo manipulado quando comparados aos do grupo intacto mostraram uma diminuição na duração desse comportamento no período 1 (1,0 vez), nos outros períodos não houve

diferenças significantes entre os grupos experimentais e o grupo intacto. Quando os machos dos grupos experimentais foram comparados dentro do próprio grupo, porém em períodos diferentes, mostraram uma diminuição da duração desse comportamento (período 2 comparado ao período 1 = 40,0 e 3,0 vezes; no período 3 comparado ao período 1 = 40,0 e 3,0 vezes, manipulados e estimulados, respectivamente) (Fig. 5).

c) Duração de esquadrihar (olhar para área do gato)

As fêmeas dos grupos experimentais, quando comparadas as do grupo intacto, dentro do mesmo período, não mostraram diferenças significantes na duração desse comportamento em nenhum dos períodos analisados. As fêmeas dos grupos experimentais e do grupo intacto quando comparadas ao próprio grupo, porém em períodos diferentes, mostraram um aumento da duração do comportamento de esquadrihar (período 2 comparado ao período 1 = 3,0, 4,0 e 5,0 vezes, intactas, manipuladas e estimuladas, respectivamente). Nos machos dos grupos experimentais, quando analisados no mesmo período, mostraram um aumento na duração do esquadrihar (1,7 e 2,1 vezes, manipulados e estimulados, respectivamente). Quando a comparação foi realizada entre os machos do mesmo grupo em períodos diferentes, os animais dos grupos experimentais mostraram um aumento da duração de esquadrihar no período 2 comparado ao período 1 (4,0 e 3,8 vezes, manipulados e estimulados respectivamente) (Fig. 5).

2.2. Labirinto em cruz elevado

a) Resultados dos comportamentos em fêmeas

As fêmeas do grupo manipulado comparadas as dos grupos intacto e estimulado, mostraram uma diminuição da frequência no braço fechado (1,0 e 2,0 vezes, comparadas as intactas e estimuladas, respectivamente) e no braço aberto (1,5 vezes tanto para a comparação com as intactas quanto para as estimuladas). Em relação à duração, as fêmeas manipuladas permaneceram por um período de tempo menor no braço aberto (1,4 e 1,6 vezes, comparadas as intactas e estimuladas, respectivamente). Em consequência dos resultados anteriores, a fêmea manipulada também teve uma diminuição da frequência total de entradas nos braços (1,3 e 1,2 vezes, comparadas as intactas e estimuladas, respectivamente). As fêmeas do grupo estimulado não foram significativamente diferentes das fêmeas do grupo intacto nos comportamentos avaliados.

Os machos dos grupos experimentais comparados aos do grupo intacto, mostraram uma diminuição da duração no braço aberto (0,6 e 0,7 vez, manipuladas e estimuladas, respectivamente). Nos outros comportamentos avaliados não houveram diferenças significativas entre os grupos (Tab. 10).

Tabela 10- Efeito da estimulação neonatal sobre os comportamentos no teste de labirinto em cruz elevado em animais na fase peripuberal (33-35 dias de idade).

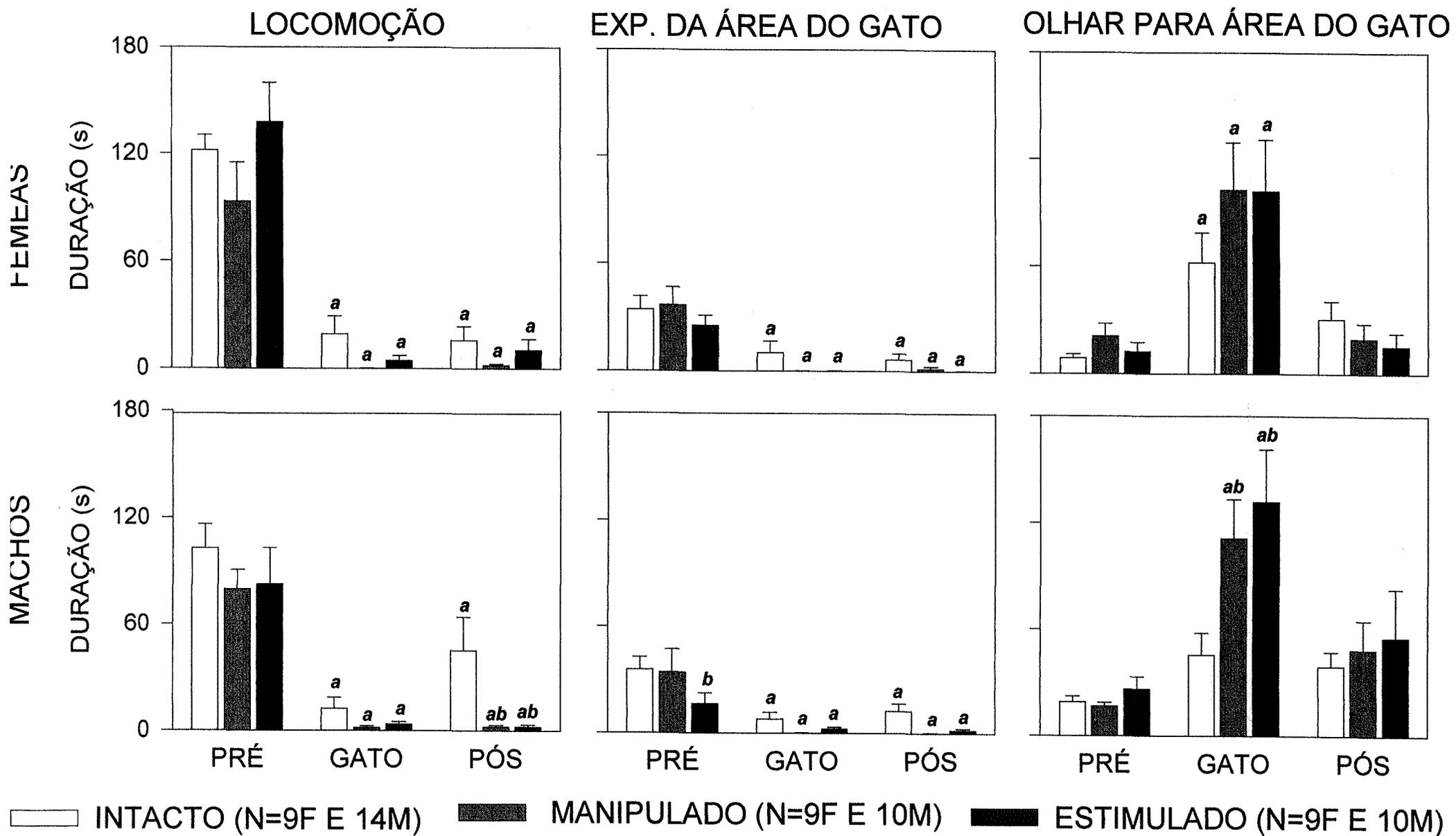
Dados expressos como média \pm EPM.

COMPORTAMENTOS	SEXO	INTACTO	MANIPULADO	ESTIMULADO
FREQ. BRAÇO FECHADO	Fêmeas	5,7 \pm 0,9	2,8 \pm 0,8 * #	5,4 \pm 1,1
	Machos	4,7 \pm 0,6	3,4 \pm 0,7	4,3 \pm 0,9
FREQ. BRAÇO ABERTO	Fêmeas	5,0 \pm 0,9	2,0 \pm 0,8 * #	5,0 \pm 1,3
	Machos	4,0 \pm 0,8	2,7 \pm 0,9	2,6 \pm 0,8
FREQ. CABEÇA P/ FORA BRAÇO ABERTO	Machos	7,0 \pm 1,0	4,1 \pm 1,4	5,8 \pm 1,5
	Fêmeas	7,0 \pm 1,6	2,3 \pm 0,9	9 \pm 2,4
DUR. BRAÇO FECHADO (s)	Fêmeas	238,0 \pm 11,6	276,8 \pm 10,2	232,7 \pm 14,5
	Machos	232,0 \pm 9,6	254,7 \pm 15,7	259,7 \pm 10,6
DUR. BRAÇO ABERTO (s)	Fêmeas	49,7 \pm 11,4	20,8 \pm 10,4 * #	54,0 \pm 14,1
	Machos	61,1 \pm 10,3	38,7 \pm 14,2 *	35,2 \pm 10,0 *
PFBA (%)	Fêmeas	44	30	42
	Machos	40	30	30
PTBA (%)	Fêmeas	17	7	20
	Machos	20	10*	10
FREQ. TOT. ENTRADAS	Fêmeas	11 \pm 1,8	4,8 \pm 1,6 * #	10 \pm 2,3
	Machos	8,7 \pm 1,3	6,1 \pm 1,6	6,9 \pm 1,6

* $p < 0,05$ comparado ao grupo intacto

$p < 0,05$ comparado ao grupo estimulado

Figura 5- Efeito da estimulação neonatal sobre a duração dos comportamentos, no campo-aberto com o predador, em machos e fêmeas na fase peripuberal. Dados expressos pela média \pm EPM.



^a P<0.05 comparado ao mesmo grupo no período pré-gato

^b P<0.05 comparado ao grupo intacto no mesmo período

Figura 6- Efeito da Estimulação Neonatal sobre a duração dos comportamentos, no campo-aberto com o predador, em machos e fêmeas na fase perinatal. Dados expressos pela média ± SEM

3. DISCUSSÃO

-EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE O COMPORTAMENTO DE RATOS ANALISADOS NA FASE PERIPUBERAL.

Nos experimentos relatados anteriormente, a manipulação ou estimulação aversiva no período neonatal provocaram profundas modificações comportamentais nos animais analisados na idade adulta.

O presente experimento estudou a ocorrência destas modificações na fase peripuberal (33-35 dias de idade). Estes animais, tanto machos quanto fêmeas, manipulados ou estimulados aversivamente no período neonatal, e testados na fase peripuberal no campo aberto com o predador, não mostraram diferenças do grupo intacto em relação à atividade locomotora nos 3 períodos analisados (antes da presença do predador, na presença do predador e após a retirada do predador). Em relação à exploração da área do gato, não houve diferenças significantes entre os grupos nos períodos 2 e 3, porém os machos estimulados aversivamente no período neonatal mostraram uma diminuição deste comportamento no período 1 em relação ao grupo manipulado e intacto no mesmo período. Em relação ao comportamento de olhar para o local onde está ou esteve o predador, as fêmeas não mostraram diferenças significantes entre os grupos experimentais em nenhum dos 3 períodos analisados, porém os machos dos grupos experimentais, no período 2, tiveram um aumento da duração desse comportamento comparados ao grupo intacto. No teste de labirinto em cruz elevado, tanto os machos quanto às fêmeas peripuberais dos grupos experimentais, não mostraram diferenças significantes em relação aos intactos.

Os resultados do experimento em animais manipulados e estimulados aversivamente no período neonatal analisados na fase peripuberal mostraram grandes diferenças em relação aos animais analisados na fase adulta. Os comportamentos de locomoção e exploração da área do predador no campo aberto, nos grupos experimentais de animais adultos possuem uma duração muito maior quando comparados ao intacto. Resultados esses que não se reproduzem quando os animais são analisados na fase peripuberal, pois não mostram diferenças significantes em relação ao grupo intacto, e quando mostram pequenas diferenças é no sentido dos animais manipulados ou estimulados aversivamente no período neonatal possuírem um medo maior do que os animais intactos. No comportamento de olhar para a área do gato, as fêmeas peripuberais não mostraram diferenças significantes, porém os machos ficaram muito mais tempo olhando para a área onde está ou estava o predador do que os animais intactos, resultados completamente contrários aos observados nos animais adultos. Nos adultos, resultados no labirinto não mostraram tantas diferenças como os do campo aberto com o predador, porém as fêmeas do grupo estimulado aversivamente no período neonatal tem uma frequência total de entradas nos braços, maior do que a das fêmeas intactas. Esse resultado provavelmente está relacionado a maior atividade de locomoção desses animais, porém isso não foi observado nas fêmeas dos grupos experimentais na fase peripuberal.

No período neonatal, os hormônios gonadais tem a função de organizar permanentemente o SNC principalmente o padrão fisiológico da função reprodutiva (Young, 1961, Levine & Mullins, 1964). Estimulação do animal no período neonatal pode levar a uma elevação de hormônios que se encontram em

baixa concentração, como por exemplo, a separação do filhote da mãe nesta idade gera uma elevação do nível de testosterona (Slob et al., 1980). A ação dos esteróides no animal neonato alteram o padrão e provavelmente a quantidade da secreção de hormônios quando adultos (Levine & Mullins, 1966). Essas elevações hormonais geradas pela estimulação neonatal pode ter originado no macho uma sensibilização precoce do cérebro aos hormônios gonadais, assim como alterações na organização dos comportamentos. Durante o período peripuberal os hormônios gonadais se encontram em fase de elevação, porém os níveis ainda são inferiores às concentrações dos esteróides gonadais observadas no animal adulto (Ojeda e Ramirez, 1974, Andrews e Ojeda, 1977).

Aparentemente a alteração causada pela estimulação (tanto manipulação quanto estimulação aversiva) no período crítico neonatal necessita de um substrato neural e/ou de quantidades hormonais iguais às encontradas num animal adulto para deflagrar as alterações comportamentais. Essa afirmação pode ser confirmada devido ao fato de que os níveis plasmáticos de testosterona em animais adultos não mostram diferenças entre os grupos experimentais e o intacto.

CAPÍTULO 3

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE
COMPORTAMENTOS DE RATOS ADULTOS
GONADECTOMIZADOS NA FASE PERIPUBERAL (27 DIAS DE
IDADE)**

EXPERIMENTO 3

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE COMPORTAMENTOS DE RATOS ADULTOS GONAECTOMIZADOS PRÉ-PÚBERES (27 DIAS DE IDADE).

Objetivos específicos: Este experimento analisou as relações entre hormônios gonadais e os efeitos comportamentais da estimulação neonatal. Os animais machos e fêmeas foram estimulados no período neonatal (dia 1 ao dia 10), gonadectomizados aos 27 dias de idade e testados no campo aberto com predador e no labirinto em cruz elevado aos 90-100 dias idade.

1.MATERIAIS E MÉTODOS

1.1.Animais

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da variedade Wistar provenientes dos biotérios do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Os animais foram estudados entre 90 e 100 dias de idade, divididos nos seguintes grupos experimentais :

- a) Grupo I - INTACTO - animais que não foram manipulados pelo experimentador nem ou pelos tratadores durante todo período de amamentação;
- b) Grupo II - MANIPULAÇÃO - animais foram gentilmente manipulados pelo experimentador por 1 min uma vez por dia durante os 10 primeiros dias de vida;

Em torno de 7 dias antes do parto, as fêmeas grávidas foram colocadas em caixas individuais. O dia do nascimento (dia 0) foi controlado rigorosamente e a ninhada padronizada em 8 filhotes por mãe. No dia seguinte ao nascimento dos filhotes, foi iniciado o procedimento de manipulação. Logo após cada sessão de manipulação os filhotes retornaram para a caixa com a mãe. Depois desse período de estimulação neonatal, os ratos permaneceram com a mãe até o

desmame (21 dias pós-parto) quando foram separados e mantidos em caixas (41x34x17cm) com animais do mesmo sexo e idade (de 2-5 animais por caixa) e tratados segundo a rotina padrão do biotério. Cada grupo experimental era formado por animais não pertencentes à mesma ninhada (não-irmãos). Todos os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas (período claro de 4:00 a 16:00). A temperatura foi mantida constante em torno de 22^o C. Os animais tinham livre acesso à água e a ração específica para roedores (Nutrilab, Brasil) durante todo o experimento. Aos 27 dias de idade os animais eram gonadectomizados e após retornavam as caixas para serem analisados entre 90- e 100 dias de idade.

1.2. Metodologia da manipulação

A manipulação consistia em remover os filhotes das mães, colocando-os junto em um recipiente plástico pequeno forrado com toalha de papel e levados para uma sala diferente a que se encontravam com a mãe (sendo que a temperatura desta outra sala também foi mantida a 22^o C). Os animais eram gentilmente manipulados pelo experimentador por 1 min e depois retornavam para a caixa com a mãe.

1.3. Processo Cirúrgico

Os machos foram anestesiados com ketamine:xylazine (10:50 mg/kg, i.m.), colocados em uma prancha cirúrgica específica para ratos. Foi feita uma incisão na epiderme entre os testículos, retirada a túnica albugínea e evidenciado os testículos que foram retirados de maneira cuidadosa para evitar hemorragias internas. Após a epiderme foi suturada, o animal retornava para a caixa moradia, e sua recuperação foi acompanhada pelo experimentador.

As fêmeas foram anestesiadas com ketamine:xylazine (10:50 mg/kg, i.m.), colocadas em uma prancha cirúrgica específica para ratos. Foi feita uma incisão na parte ventral do abdome, rebatido o intestino e retirado somente o ovário, as

trompas foram cuidadosamente lacradas para evitar hemorragias. Após eram suturadas e retornavam para a caixa moradia, sendo que a recuperação foi acompanhada pelo experimentador.

1.4.Registro dos comportamentos

1.4.1. Campo-aberto com um predador

Foram analisados animais adultos (90-100 dias de idade) que foram submetidos a castração antes da puberdade (27 dias de idade) machos e fêmeas dos grupos intacto (N=10 machos e 11 fêmeas) e manipulados (N= 10 machos e 13 fêmeas).

Foram analisados duração dos comportamentos de locomoção e explorar a área do predador. A metodologia experimental utilizada foi realizada da mesma maneira que no experimento 1 (item 1.2.1).

1.4.2. Labirinto em cruz elevado

Foram analisados animais adultos (90-100 dias de idade) castrados antes da puberdade (27 dias de idade), ratos machos e fêmeas divididos nos grupos intacto (N= 10 fêmeas e 11 machos), manipulados (N= 9 fêmeas e 14 machos) estimulados (N= 14 fêmeas e 12 machos).

Os comportamentos analisados foram frequência e duração no braço aberto, braço fechado, cabeça para fora do braço aberto e esquadrihar. Também foram analisados os índices de porcentagem de vezes que o animal entra no braço aberto, porcentagem de tempo que o animal permanece no braço aberto e a frequência total de entradas nos braços. A metodologia experimental utilizada foi a mesma do experimento 1 (item 1.3.3).

1.5. Análise Estatística

A análise do campo aberto com o predador foi realizada comparando-se o grupo manipulado ao grupo intacto. Os resultados foram expressos por média (\pm epm) e comparados entre os grupos experimentais através do teste-t de Student para amostras independentes (Zar, 1996). A análise do labirinto em cruz elevado foi realizada comparando-se o grupo estimulado e manipulado ao grupo intacto, através de uma análise de variância (ANOVA) e quando necessário foi utilizado o teste de Mann-Whitney. O nível de significância aceito foi sempre de $p < 0,05$.

2. RESULTADOS

2.1. Campo aberto com o predador:

a) Duração da locomoção:

Tanto machos quanto fêmeas de todos os grupos analisados mostraram uma diminuição desse comportamento no período com e pós-gato comparados ao período pré-gato. Não houve diferenças, tanto em machos quanto em fêmeas, dos grupos experimentais comparados ao grupo intacto nos 3 períodos analisados (Fig. 6).

b) Duração da exploração da área do gato:

As fêmeas dos grupos experimentais não foram diferentes das do grupo intacto nos 3 períodos analisados. Os machos dos grupos experimentais mostraram uma diminuição desse comportamento quando comparados aos intactos no período pré-gato, porém nos períodos com e pós-gato não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais e o intacto (fig. 6).

1.2. Labirinto em cruz elevado:

a) Braço fechado:

A frequência de entradas nos braços fechados dos grupos experimentais, tanto machos quanto fêmeas, não foi diferente da frequência do grupo intacto. A duração deste comportamento não foi diferente entre os grupos experimentais e intacto, mas os machos do grupo estimulado aversivamente no período neonatal mostraram uma diminuição da duração quando comparados aos grupos intacto e manipulado (Tab.11).

b) Braço aberto:

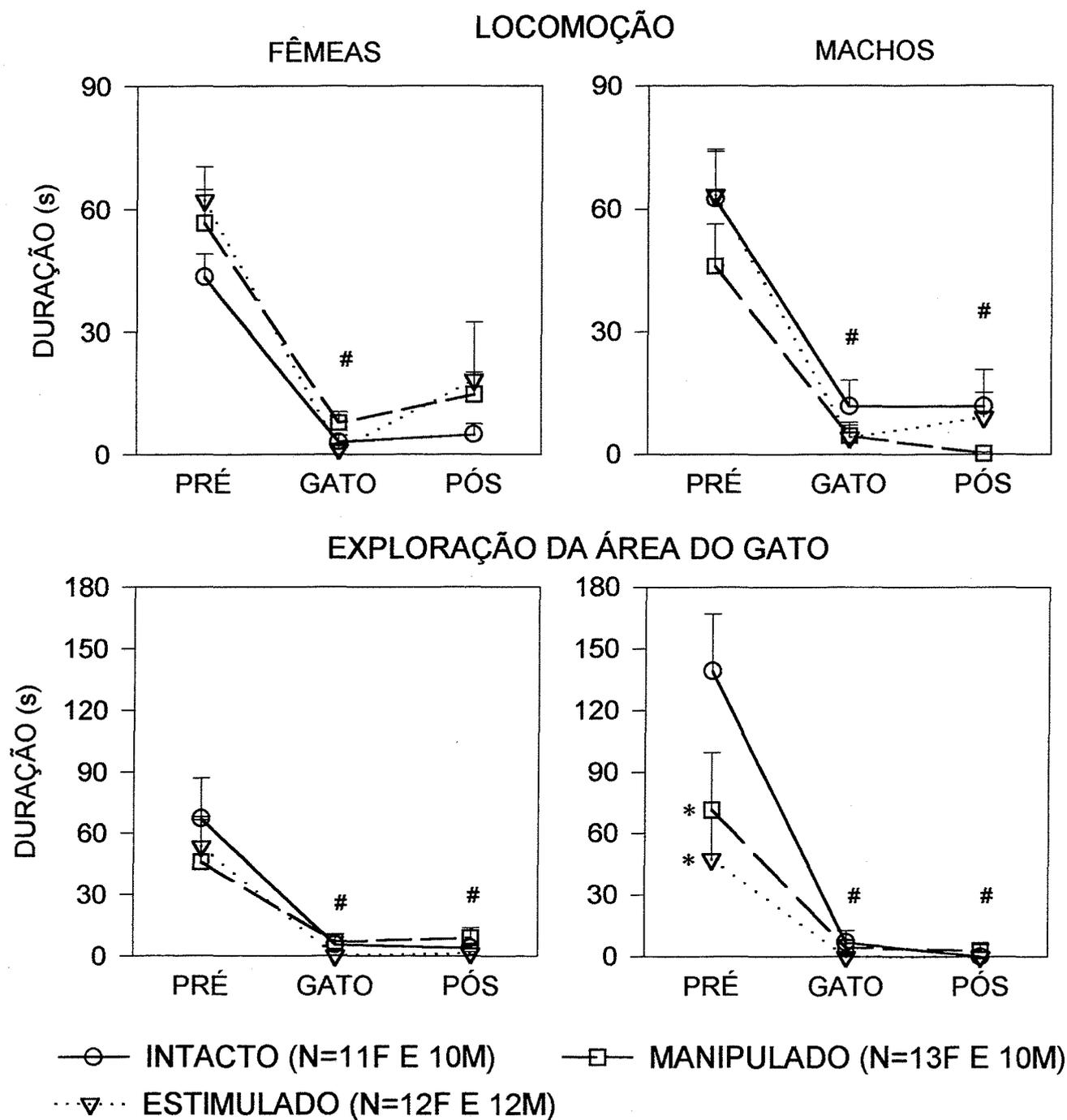
A frequência de entradas nos braços abertos dos grupos experimentais, tanto machos quanto fêmeas, não foi diferente da frequência do grupo intacto. A duração deste comportamento nas fêmeas dos grupos experimentais não foi diferente do intacto, mas os machos do grupo estimulado aversivamente no período neonatal mostraram uma diminuição da duração quando comparados aos grupos intacto e manipulado (Tab. 11).

COMPORTAMENTOS	SEXO	INTACTO	MANIPULADO	ESTIMULADO
FREQ. BRAÇO FECHADO	Fêmeas	3,5±0,8	3,0±0,7	4,5±0,8
	Machos	2,8±0,7	4,1±0,7	5,7±1,1
FREQ. BRAÇO ABERTO	Fêmeas	1,9±0,4	1,7±0,5	2,7±0,5
	Machos	2,3±1,0	2,0±0,4	4,2±0,7
FREQ. CABEÇA FORA BRAÇO ABERTO	Fêmeas	7,0±1,6	5,2±1,4	6,9±1,1
	Machos	4,8±1,4	5,8±1,2	9,9±1,9 *#
FREQ. ESQUADRI NHAR	Fêmeas	7,7±1,6	7,9±1,9	8,6±1,1
	Machos	7,0±1,4	8,6±1,1	8,4±1,2
DUR. BRAÇO FECHADO (s)	Fêmeas	259,0±10,2	269,5±5,4	238,4±15,6
	Machos	266,9± 10,9	253,7±7,8	216,2±16,5*#
DUR. BRAÇO ABERTO (s)	Fêmeas	23,6±7,8	15,8±4,9	41,7±14,9
	Machos	19,4±8,6	23,6±5,2	55,5±12,4 *#
PFBA (%)	Fêmeas	30±6	30±7	40±5
	Machos	40±7	30±5	40±3
PTBA (%)	Fêmeas	10±3	5±2	30±5
	Machos	7±3	9±2	20±5 *#
FREQ. TOT. ENTRADAS	Fêmeas	5,4±1,3	4,7±1,0	7,2±1,3
	Machos	5,1±1,6	6,1±1,0	9,8±1,8

* P<0,05 quando comparado ao grupo intacto

#P<0,05 quando comparado ao grupo manipulado

Tabela 11- Efeito da estimulação aversiva neonatal sobre a frequência e duração de comportamentos no labirinto em cruz elevado em machos e fêmeas adultos, castrados aos 27 dias de idade. Dados expressos como média ± EPM.



* $P < 0.05$ comparado ao grupo intacto no mesmo período

$P < 0.05$ comparado ao período pré-gato no mesmo grupo

Figura 6- Efeito da Estimulação Neonatal sobre a duração dos comportamentos no campo-aberto com o predador em animais adultos que foram gonadectomizados aos 27 dias de idade. Dados expressos pela média+ EPM.

3. DISCUSSÃO

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE O COMPORTAMENTO DE ANIMAIS CASTRADOS AOS 27 DIAS DE IDADE

Neste experimento, foram analisados animais adultos, intactos e manipulados, que sofreram castração antes da puberdade (27 dias de idade). Quando analisados no campo aberto com o predador, os animais do grupo manipulado não mostraram diferenças significantes do comportamento de locomoção em relação ao grupo intacto em nenhum dos 3 períodos analisados tanto em machos quanto em fêmeas. Quanto à exploração da área do gato, não ocorreram diferenças significantes entre os grupos no 2^o e 3^o períodos analisados, porém nos machos no 1^o período (pré-gato) houve uma diminuição da exploração da área do gato no grupo manipulado comparado ao grupo intacto, que deve ser entendido como uma diminuição da exploração de um ambiente novo devido ao animal não saber que será colocado o gato naquele local, embora a atividade locomotora geral não tenha sido alterada. Os resultados observados em animais castrados combinam com os encontrados no experimento em animais peripuberais. Isso mostra que sem hormônios gonadais (experimento 3) ou em baixa quantidade (experimento 2) as alterações comportamentais geradas pela manipulação ou estimulação aversiva neonatal não são observados. Estes resultados corroboram a hipótese de que os hormônios esteróides em quantidades normais de um animal adulto parecem ser um fator determinante para as alterações comportamentais decorrentes da manipulação ou de estimulações aversivas no período neonatal.

CAPÍTULO 4

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE A DENSIDADE DE NEURÔNIOS

EXPERIMENTO 4 -

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE A DENSIDADE DE NEURÔNIOS

Objetivos específicos: analisar a relação da estimulação aversiva no período neonatal sobre a densidade neuronal (método Disector) em áreas envolvidas com comportamentos. Os animais foram estimulados no período neonatal (dia 1 ao dia 10) e a contagem neuronal foi realizada na amígdala medial e córtex frontal aos 11, 35 e 70 dias de idade.

1.MATERIAIS E MÉTODOS

11. Animais:

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da variedade Wistar provenientes dos biotérios do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Os animais foram estudados aos 11, 35 e 70 dias de idade. Todos os grupos abaixo possuíam um N de 5 animais tanto para machos quanto para fêmeas para cada uma das idades estudadas. Os grupos experimentais foram os seguintes:

Grupo I - INTACTO – animais que não foram manipulados pelo experimentador nem ou pelos tratadores durante todo período de amamentação;

Grupo II - MANIPULAÇÃO - animais foram gentilmente manipulados pelo experimentador por 1 min uma vez por dia durante os 10 primeiros dias de vida;

Grupo III- ESTIMULADOS - animais que foram submetidos a estimulação aversiva pelo experimentador por 10 min uma vez por dia durante os 10 primeiros dias de vida.

Em torno de 7 dias antes do parto, as fêmeas grávidas foram colocadas em caixas individuais. O dia do nascimento (dia 0) foi controlado rigorosamente e a ninhada padronizada em 8 filhotes por mãe. No dia seguinte ao nascimento dos filhotes, foi iniciado o procedimento de manipulação ou estimulação aversiva. Logo após cada sessão de manipulação ou estimulação aversiva os filhotes retornaram

para a caixa com a mãe. Depois desse período de estimulação neonatal, os ratos permaneceram com a mãe até o desmame (21 dias pós-parto) quando foram separados e mantidos em caixas (41x34x17cm) com animais do mesmo sexo e idade (de 2-5 animais por caixa) e tratados segundo a rotina padrão do biotério. Cada grupo experimental era formado por animais não pertencentes à mesma ninhada (não-irmãos). Todos os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas (período claro de 4:00 a 16:00). A temperatura foi mantida constante em torno de 22^o C. Os animais tinham livre acesso à água e a ração específica para roedores (Nutrilab, Brasil) durante todo o experimento.

O grupo de animais analisados aos 11 dias de idade tinha seu cérebro retirado 24h após a última manipulação ou estimulação.

1.2. Metodologia da Estimulação Aversiva

A estimulação aversiva do experimento 4 foi realizada da mesma maneira que a do experimento 1 (item 1.2).

1.3. Processo cirúrgico

Os ratos foram anestesiados com dose elevada de ketamine xylazine (10:50 mg/kg, i.m.). Foi realizada uma abertura na altura do diafragma e rebatido as costelas, evidenciando o coração; foi feito um bloqueio da aorta-intercostal e injetado no ventrículo esquerdo 40 ml de água destilada para lavagem do cérebro; após foi injetado 40 ml de formol 10% para fixação do mesmo. Após feito este processo, foi realizado a abertura da calota craniana para retirada do cérebro, este processo exigiu uma grande precisão para não ocorrer lesões na massa encefálica.

O cérebro permaneceu 1 semana em formol 10%, para fixação. Após o mesmo foi lavado durante 24h em água corrente para retirada do formol e para iniciar o processo histológico.

1.4. Processo histológico

Após ser lavado em água corrente por 24 horas, foi iniciado o processo de desidratação do cérebro e posterior emblocamento que incluiu as seguintes etapas:

- álcool 70%;
- álcool 80%;
- álcool 95%;
- álcool 95%;
- álcool 95%;
- 3 x de álcool absoluto;
- 3 x de xilol;
- 3 banhos de histosec-paraplastic, sendo que o cérebro será incluído em sua posição final na última passagem de paraplastic.

Todos os banhos foram de 40 min. As lâminas para deposição do material foram previamente gelatinizadas para melhor adesão do corte, e para que o mesmo não soltasse da lâmina no processo de coloração. Foram realizados córtex histológicos no micrótomo sendo que os mesmos possuíam uma espessura de 7 μm , e as áreas a serem analisadas no microscópio foram evidenciadas com o auxílio do Atlas histológico do cérebro do rato (Paxinos e Watson, 1986). Após o corte as lâminas eram secadas em estufa por 24 horas, e então era iniciado o processo de coloração que compreendia as etapas abaixo:

- xilol I
- xilol II
- álcool 100%
- 3 banhos de álcool 95%
- álcool 80%
- álcool 70%
- água destilada
- cresyl-violeta
- 3 banhos de álcool 95%
- álcool 100%

-xilol I

-xilol II

Todas as passagens acima duravam em torno de 2 min cada uma, com exceção do cresyl-violeta que durava em média 30s, tempo que era um pouco variável conforme a intensidade de coloração do mesmo.

A montagem final foi realizada com as lâminas permanecendo no xilol I, sendo retiradas uma a uma para evitar o ressecamento, e então as lâminas eram coladas com Entellan.

1.5. Metodologia do disector

A metodologia do disector faz parte da estereologia, que analisa o corpo dentro de um espaço tridimensional (Cavalieri, 1635; Weibel, 1979; Gundersen & Jensen, 1987; Gundersen et al., 1988; Cruz-Orive & Weibel, 1990; Mandarim de Lacerda, 1995; Howard & Reed, 1998).

A contagem dos neurônios corados com cresyl violeta na parte medial da amígdala medial e camada 2 e 3 do córtex frontal foi realizada dentro de uma faixa de 3 μ m dentro do corte e observado sempre o "look up" para efeito de contagem.

A análise da imagem foi realizada com microscópio óptico marca Zeiss de alta resolução, sendo que a objetiva 10x foi utilizada para a localização da área e a objetiva de 40x para contagem dos neurônios.

Acoplado ao microscópio foi colocado uma câmara de vídeo que envia esta imagem para o monitor, que pode ser de computador ou uma televisão.

Na tela da televisão foi colocado um acetato de 21.7 x 33 cm que é considerado a área teste, sendo que os núcleos que tangenciaram dois lados pré-estabelecidos do acetato não eram contados. Os núcleos que estivessem prescritos no "look up" e no "look down" também não eram contados (Fig. 7).

De cada área foram feitos em torno de 100 cortes correspondentes à totalidade da porção que se tinha objetivo contar o número de células. No caso da amígdala medial, nosso objetivo era analisar apenas a porção central da amígdala

medial (parâmetros antero-posterior de $-1,8\text{mm}$ a $-3,6\text{mm}$ do bregma) (Fig.8) e no córtex pré-frontal as camadas 2 e 3 localizadas entre os parâmetros antero-posterior ($5,20$ a $2,70\text{mm}$ do bregma) (Fig.9) do atlas de Paxinos e Watson 1988. Cada lâmina continha 5 cortes. Foram contados os neurônios de 5 cortes escolhidos aleatoriamente pelos analisadores. Sendo que cada núcleo era considerado um neurônio.

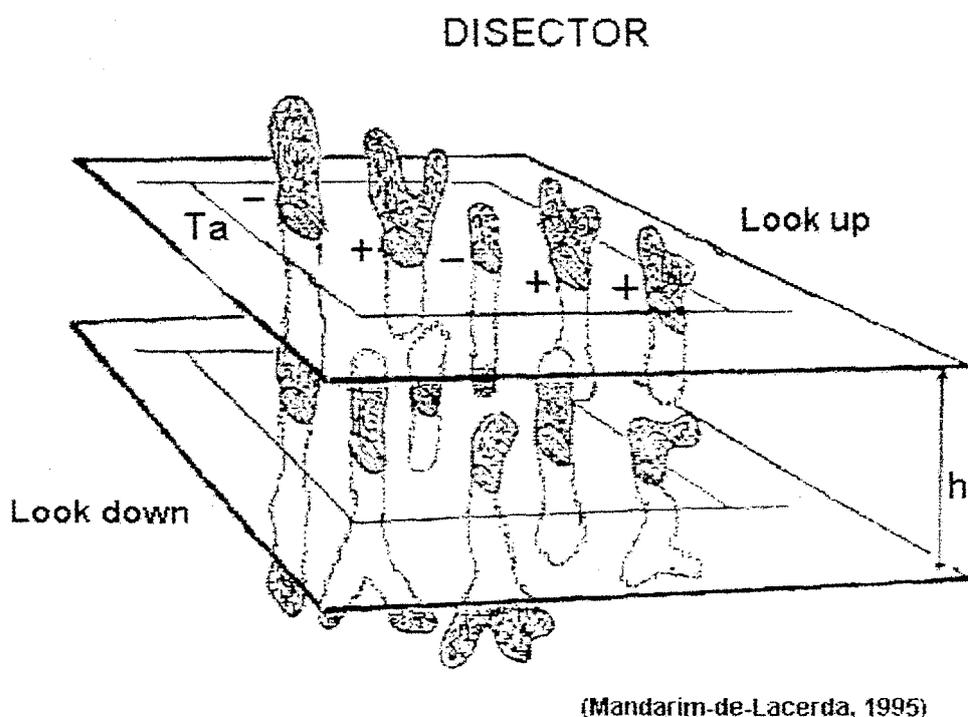


Figura 7- Esquema do disector. Dois cortes paralelos e a uma distância conhecida passam pela estrutura. Contamos os perfis que aparecem num dos cortes “look up” (+) e não no outro “look down” (-), dentro da área teste (Ta).

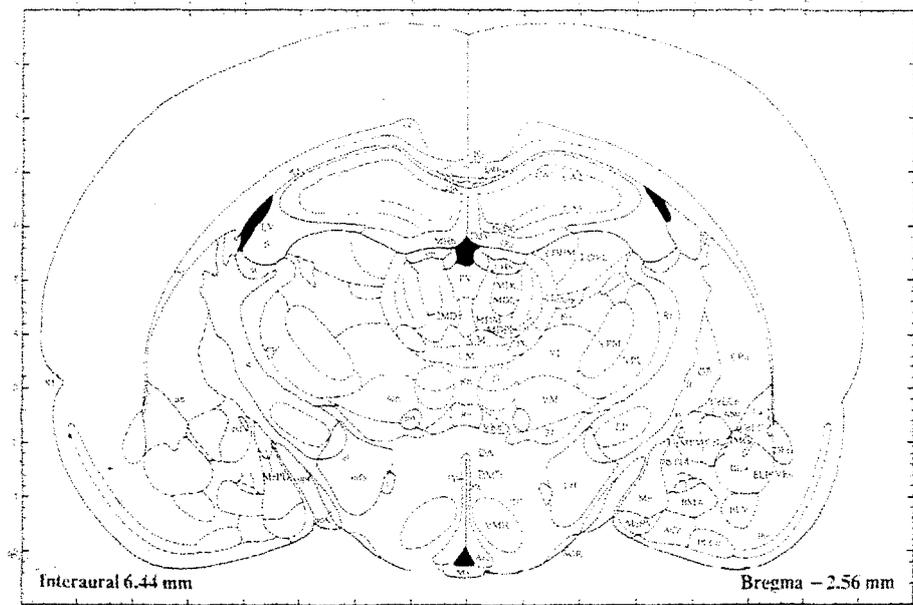
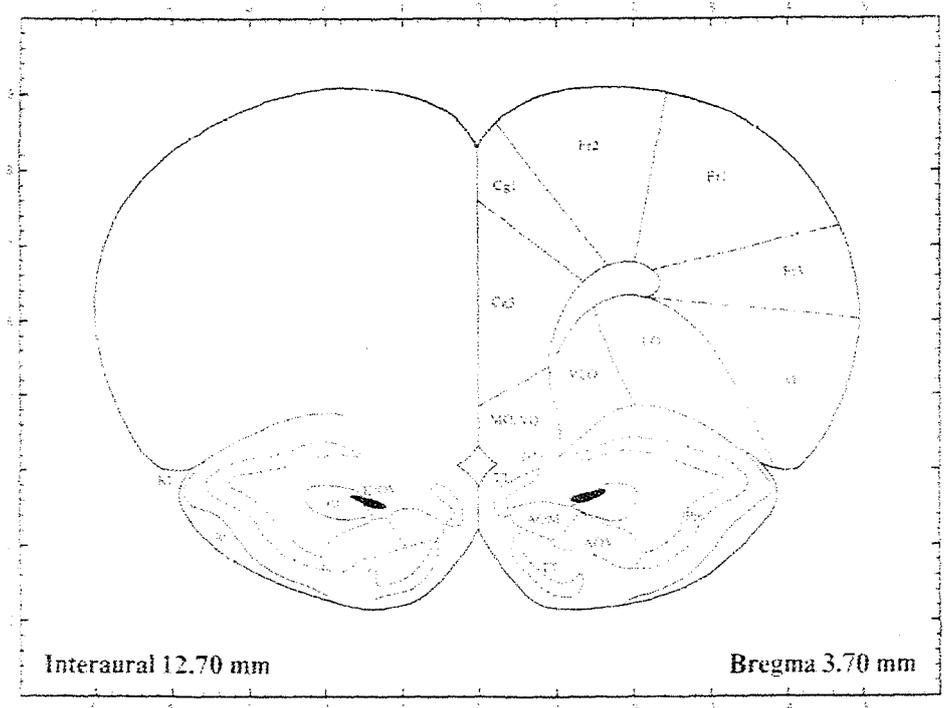


Figura 8- Área da amígdala medial utilizada como parâmetro para contagem neuronal.
Fonte: Paxinos e Watson, 1986.



-Figura 9- Área do córtex pré-frontal (Fr 2) utilizada como parâmetro para contagem neuronal.
Fonte: Paxinos e Watson, 1986.

1.6. Análise Estatística

A análise foi realizada comparando-se o grupo estimulado e manipulado ao grupo intacto, bem como comparou-se o grupo estimulado ao manipulado. Foi realizado o teste não-paramétrico Mann-Whitney. O nível de significância aceito foi de $p < 0,05$.

2. RESULTADOS

2.1. Análise da densidade neuronal na porção central da amígdala medial:

a) Aos 11 dias de idade:

A contagem do número de neurônios nesta área em fêmeas mostrou uma diminuição da densidade neuronal nos grupos experimentais quando comparados ao grupo intacto. Em machos não houve diferença significativa entre os grupos (Fig. 10).

b) Aos 35 dias de idade:

A densidade neuronal nesta idade, em machos e fêmeas, não mostrou diferença dos grupos experimentais quando comparados ao grupo intacto (Fig. 10).

c) Aos 70 dias de idade:

A densidade neuronal nas fêmeas e machos dos grupos experimentais diminuiu quando comparados ao grupo intacto (Fig. 10).

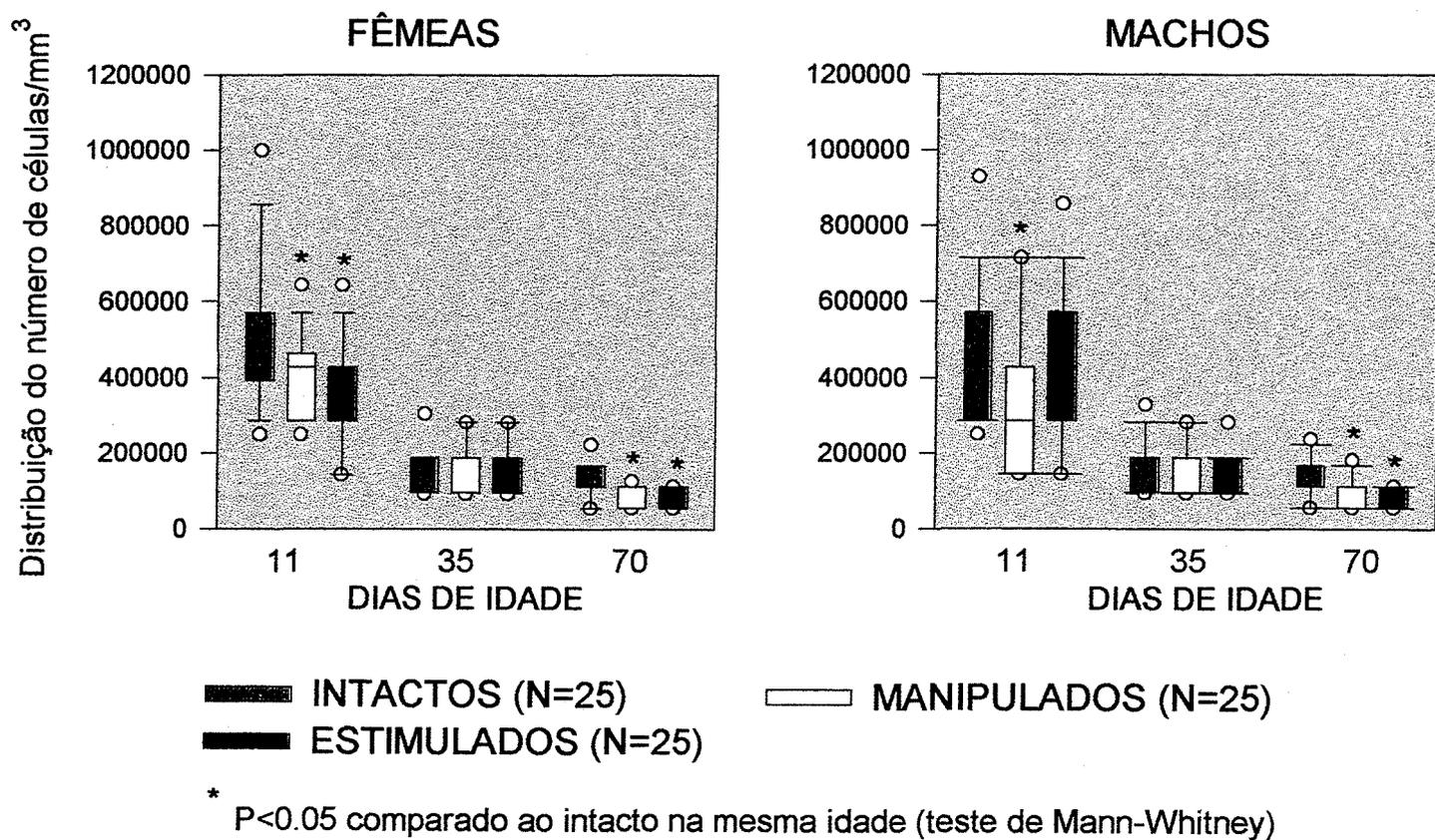


Figura 10- Efeito da estimulação Neonatal sobre a densidade neuronal (Nv), na porção central da amígdala medial, em machos e fêmeas, analisados aos 11, 35 e 70 dias de idade. Dados expressos pela mediana (intervalo interquartis).

2.2. Análise da densidade neuronal no córtex pré-frontal de animais estimulados neonatal:

a) Aos 11 dias de idade:

A densidade neuronal no córtex pré-frontal nas fêmeas e machos dos grupos experimentais foi menor quando comparados ao grupo intacto (Fig. 11).

b) Aos 35 dias de idade:

A densidade neuronal no córtex pré-frontal tanto nas fêmeas quanto nos machos dos grupos experimentais não mostrou diferença significativa quando comparada a densidade neuronal do grupo intacto (Fig. 11).

c) Aos 70 dias de idade:

A densidade neuronal no córtex pré-frontal, tanto nas fêmeas quanto nos machos dos grupos experimentais não mostrou diferença significativa quando comparada a densidade neuronal do grupo intacto (Fig. 11).

ESTIMULAÇÃO NEOTANATAL- DENSIDADE DE NEURÔNIOS NAS CAMADAS 2 E 3 DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL 2 EM RATOS DE VÁRIAS IDADES

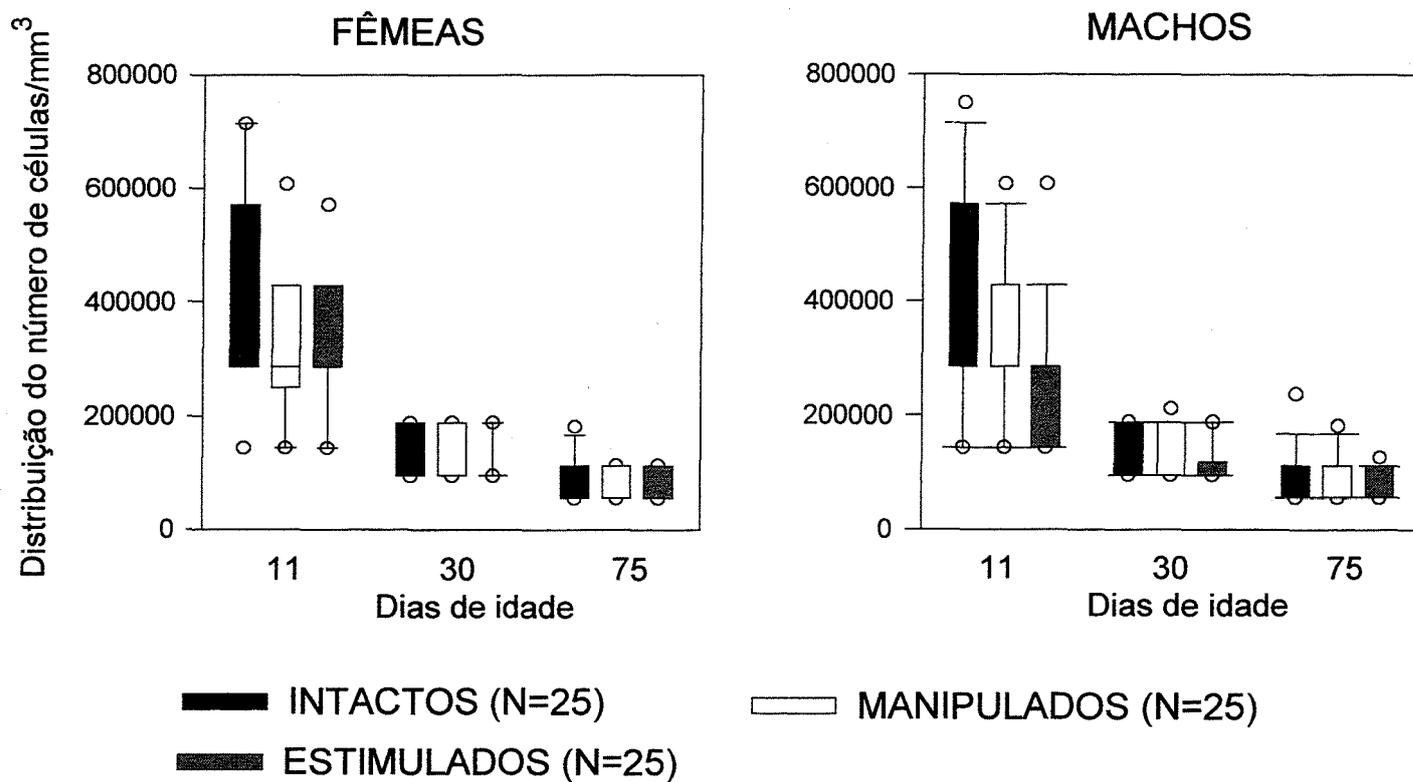


Figura 11- Efeito da Estimulação Neonatal sobre a densidade neuronal (Nv) em machos e fêmeas analisados na área do córtex pré-frontal (Fr2), aos 11, 35 e 70 dias de idade. Dados expressos pela média \pm EPM.

3. DISCUSSÃO

A discussão do experimento 4 será realizada conjuntamente no final do experimento 5.

CAPÍTULO 5

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE A MORTE DE NEURÔNIOS – APOPTOSE

EXPERIMENTO 5

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE A MORTE DE NEURÔNIOS - APOPTOSE

Objetivos específicos: analisar a relação da estimulação aversiva no período neonatal sobre a morte neuronal por apoptose (imunohistoquímica para apoptose) na amígdala medial envolvida com as alterações comportamentais e cuja densidade neuronal foi avaliada no Experimento 4. Os animais foram estimulados no período neonatal (dia 1 ao dia 5) e a contagem de células apoptóticas foi realizada na amígdala medial aos 5 dias de idade.

1.MATERIAIS E MÉTODOS

1.1.Animais:

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da variedade Wistar provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Os animais foram estudados aos 5 de idade. Os grupos abaixo possuíam um N de 6 animais tanto para machos quanto para fêmeas. Os grupos experimentais foram os seguintes:

Grupo I - INTACTO – animais que não foram manipulados pelo experimentador nem ou pelos tratadores durante o período experimental;

Grupo II - MANIPULAÇÃO - animais foram gentilmente manipulados pelo experimentador por 1 min uma vez por dia durante os 5 primeiros dias de vida;

Em torno de 7 dias antes do parto, as fêmeas grávidas foram colocadas em caixas individuais. O dia do nascimento (dia 0) foi controlado rigorosamente e a ninhada padronizada em 8 filhotes por mãe. No dia seguinte ao nascimento dos filhotes, foi iniciado o procedimento de manipulação. Logo após cada sessão de manipulação os filhotes retornaram para a caixa com a mãe. Cada grupo experimental era formado por animais não pertencentes à mesma ninhada (não-

irmãos). Todos os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas (período claro de 4:00 a 16:00). A temperatura foi mantida constante em torno de 22^o C. Os animais tinham livre acesso à água e a ração específica para roedores (Nutrilab, Brasil) durante todo o experimento.

1.2. Metodologia da Manipulação

A manipulação foi realizada da mesma maneira que no experimento 3 (item 1.2).

1.3. Processo cirúrgico

Os filhotes tiveram suas cabeças decepadas, a calota craniana foi aberta para retirada do cérebro. O cérebro foi cortado em pequenos pedaços de aproximadamente 3 mm, separando a região da amígdala medial para fixação. O material foi colocado em solução de metanol + PBS (6:1) e conservado em freezer (-20^o C) por um período de 1-3 dias.

1.4. Processo Histológico

Os cérebros foram desidratados e emblocados através das seguintes etapas:

- Metanol 70% e PBS
- Metanol 80% e PBS
- Metanol 90% e PBS
- 2 banhos de Metanol P.A.
- Secagem com papel filtro
- 2 banhos de xilol
- 3 banhos de paraplastic

Todas as etapas tiveram a duração de 1 hora cada uma, e no último banho de paraplastic o material era definitivamente emblocado. Os cérebros foram cortados em micrótomo com cortes de 5 µm de espessura. As lâminas utilizadas

para deposição dos cortes passaram pelo seguinte processo para melhor aderência dos mesmos:

- limpeza em acetona uma a uma e secagem por 24h
- passagem no ácido acético 5 min
- passagem na cola 3-aminopropyltriethoxy-silane (SIGMA)

1.5. Imunohistoquímica

Este processo compreendeu as seguintes etapas:

- Incubação em H₂O₂ (5 min)
- dois banhos de PBS
- Albumina bovina à 0,1% (30 min)
- dois banhos de PBS
- Aplicação do anti-ssDNA Mab F7-26 (100µl/corte) (Marca APOSTAIN) . Anticorpo monoclonal com especificidade para marcar o condensamento da cromatina em fase apoptótica,
- Incubação em temperatura ambiente (15 min)
- dois banhos de PBS
- Aplicação de biotina conjugada (IgM) (15 min)
- PBS
- Aplicação de Extravidin-peroxidase (15 min)
- PBS
- Aplicação da solução de cromagem (DAB)
- Início do processo de coloração em Hematoxilina-Eosina (HE)

1.6. Processo de coloração para evidenciar a marcação para apoptose

- álcool 100%
- álcool 95%
- álcool 90%
- álcool 80%
- álcool 70%
- água destilada

As etapas acima foram realizadas por um tempo de 3 min cada uma.

- Hematoxilina (50 s)
- água corrente (20 min)
- Eosina (30 s)
- álcool 70% (30 s)
- álcool 90% (30 s)
- álcool 95% (1 min)
- dois banhos de álcool 100% (1 min/cada)
- Nessa etapa as lamínulas eram coladas a lâmina com enterllan.

A hematoxilina é um corante nuclear (cora a cromatina nuclear). A eosina é um corante citoplasmático (cora o citoplasma e o nucléolo).

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, sendo que foi utilizado o aumento de 10x para a localização da área e o aumento de 40x para a contagem das células. Foi utilizada ocular reticulada onde foram contados 5 cortes por animal, sendo que em cada corte foram contados 25 campos. A contagem foi realizada por dois observadores que não sabiam o grupo a que pertencia a lâmina e a porcentagem de concordância entre os mesmos foi de 98%.

1.7. Análise Estatística

A análise foi realizada comparando-se o grupo manipulado ao grupo intacto. Os resultados foram expressos por média (\pm epm) e comparados entre os grupos experimentais através do teste-t de Student para amostras independentes (Zar, 1996). O nível de significância aceito foi sempre de $p < 0,05$.

2.RESULTADOS

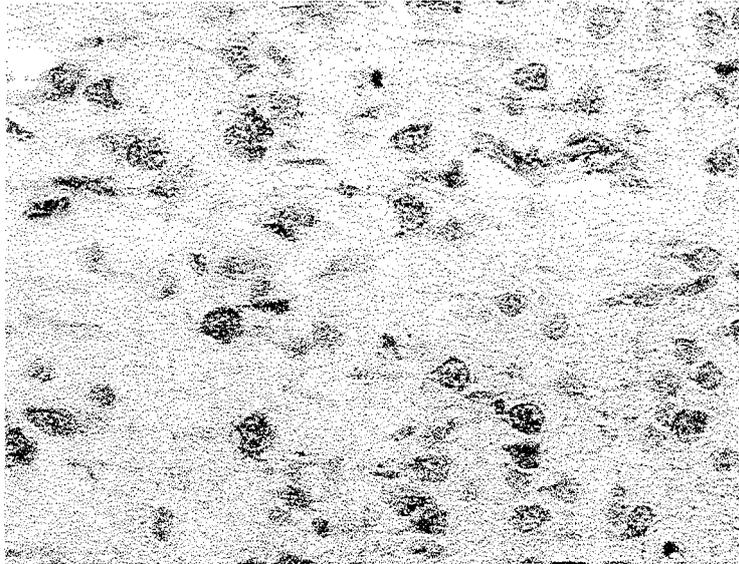
2.1. Análise do efeito da estimulação neonatal sobre a apoptose neuronal em animais com 5 dias de idade:

Os resultados mostraram que em fêmeas e machos do grupo manipulado (Fig. 12 B) ocorreu um aumento de apoptoses neuronais quando comparados ao grupo intacto (Fig. 12 A, Tab. 12).

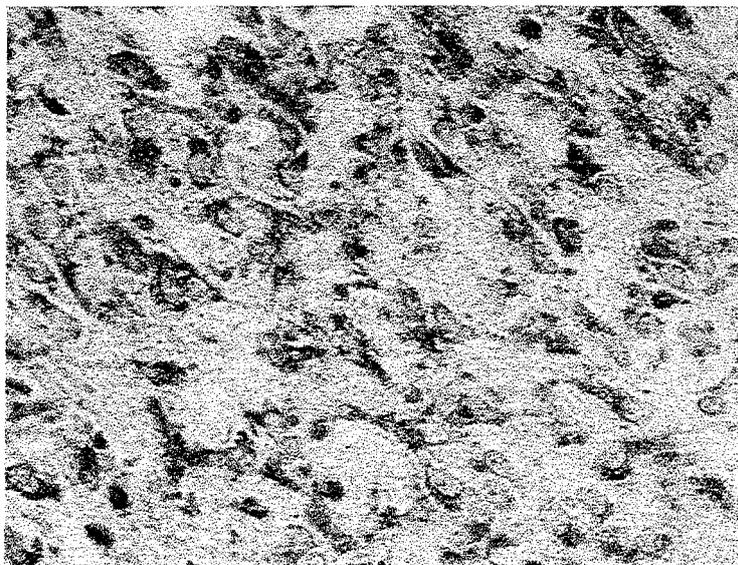
SEXO	GRUPOS	INTACTOS	MANIPULADOS
MACHOS		1,52±0,09	2,54±0,17 *
FÊMEAS		1,50±0,07	2,44±0,13 *

Tabela 12- Efeito da manipulação neonatal sobre a apoptose neuronal na amígdala medial em animais aos 5 dias de idade. Dados expressos como média ± EPM.

* p < 0,05 quando comparado ao animal intacto.



-Figura 12 A- Marcação por imunohistoquímica para apoptose. Animais intactos.



-Figura 12 B-Marcação por imunohistoquímica para apoptose. Animais manipulados.

3.DISSCUSSÃO

-EXPERIMENTOS 4 E 5

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE A DENSIDADE NEURONAL NA AMÍGDALA MEDIAL E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

O período neonatal é considerado crítico para o desenvolvimento de ratos, tanto no que diz respeito as variações hormonais bem como em relação a quantidade de neurônios. Neste período acontece a maior intensidade de nascimento, migração e morte neuronal (apoptose) (Gould et al., 1991). A intervenção neonatal neste período gera profundas modificações comportamentais em animais adultos o que nos leva a procurar entender melhor o que pode estar acontecendo com as células neurais nesta fase quando o animal é submetido a uma modificação na relação mãe-filhote. No experimento 4, foi analisada a densidade neuronal nas idades de 11, 35 e 70 dias de idade através da técnica do disector. Os resultados do disector na amígdala medial mostraram que aos 11 dias de idade as fêmeas dos grupos experimentais possuem uma menor densidade neuronal que as intactas, porém os machos não foram diferentes em relação aos intactos. Quando analisados na fase peripuberal (35 dias de idade) na mesma área, tanto os machos quanto às fêmeas dos grupos experimentais não foram diferentes do grupo intacto. E quando analisados na idade adulta (70 dias), machos e fêmeas dos grupos experimentais (manipulação ou estimulação aversiva no período neonatal) mostraram uma diminuição da densidade neuronal comparados ao intacto.

A amígdala medial é uma área sexualmente dimórfica, portanto algumas diferenças no efeito da estimulação neonatal quanto à densidade neuronal podem ser devidas a este fato. Isto é evidenciado não só por diferenças comportamentais, como também pelo efeito diferenciado da estimulação neonatal sobre a densidade neuronal em animais analisados aos 11 dias de idade. A amígdala medial é uma área envolvida na modulação de vários comportamentos como o sexual e o agressivo (Davis, 1992; Wood e Newman, 1995) e também está relacionada com a percepção do medo (Stock, 1981; Iwata, 1987). Devido a isso esta área foi escolhida para análise dos efeitos da estimulação neonatal. Os resultados mostraram que a estimulação no período neonatal, período no qual ocorrem grandes alterações no SNC, diminui a quantidade de neurônios aos 11 dias de idade, nas fêmeas e não nos machos, mas posteriormente esta diferença é compensada por algum mecanismo que faz com que na idade peripuberal não existam diferenças entre os grupos estudados, porém na idade adulta ambos machos e fêmeas do grupo experimental apresentam uma diminuição do número de neurônio nesta área.

Se traçarmos um paralelo em relação as modificações comportamentais geradas pela estimulação neonatal nos parece claro que não só as alterações comportamentais dependem dos hormônios gonadais mas também as mudanças estruturais no sistema nervoso geradas pela estimulação no período neonatal. As alterações e morfológicas nos neurônios estão relacionadas a diferenças comportamentais entre os indivíduos e podem ser afetadas por fatores como idade, hormônios gonadais e estresse (Zilles, 1992; Kolb & Whishaw, 1998). Analisando detalhadamente, notamos que aos 11 dias de idade diminui o número

de neurônios nas fêmeas e não nos machos, provavelmente devido a amígdala ser uma área sexualmente dimórfica (Hines et al., 1992). Na fase peripuberal ambos machos e fêmeas dos grupos experimentais não mostraram diferença na densidade neuronal comparados ao grupo intacto, o que da mesma forma ocorreu na análise comportamental dos animais na fase peripuberal, pois nesta fase não ocorreram modificações comportamentais dos grupos experimentais comparados aos intactos. Na fase adulta, ambos machos e fêmeas dos grupos experimentais mostraram uma diminuição da densidade neuronal comparados aos intactos e da mesma forma na análise comportamental foi quando ocorreram alterações nos testes aplicados neste trabalho. Com isso conclui-se que a manipulação ou estimulação aversiva no período neonatal gera modificações na densidade neuronal da amígdala medial aos 11 e 70 dias de idade e não na fase peripuberal. Portanto, quando os níveis plasmáticos dos hormônios gonadais estão baixos e a densidade neuronal não é diferente do grupo controle (fase peripuberal) os comportamentos não são afetados pela estimulação neonatal, porém quando os níveis plasmáticos dos hormônios gonadais são normais e a densidade neuronal é menor (fase adulta) os comportamentos são afetados pela estimulação neonatal, pelo menos em relação aos comportamentos aos quais a amígdala medial está relacionada.

A outra área estudada foi o córtex pré-frontal, e os resultados dos animais aos 11 dias de idade mostraram que tanto machos quanto fêmeas dos grupos experimentais tiveram uma redução do número de neurônios quando comparados aos intactos. Na fase peripuberal machos e fêmeas dos grupos experimentais não mostraram diferença no número de neurônios em relação ao grupo intacto. Na

fase adulta também não houve diferença quando a densidade neuronal em machos e fêmeas dos grupos experimentais comparados aos intactos.

O córtex pré-frontal foi uma área escolhida para contagem de neurônios por estar relacionada com a capacidade do animal de interação ao ambiente. Os resultados mostraram que apenas aos 11 dias de idade machos e fêmeas dos grupos experimentais tiveram uma diminuição da densidade neuronal. Resultados esses não evidenciados na fase peripuberal e adulta. Da mesma forma, no teste do nado forçado que é um modelo comportamental de depressão não houve diferenças entre os grupos experimentais e intacto, o que nos leva a conclusão que em relação aos comportamentos relacionados com o córtex pré-frontal e a densidade neuronal a estimulação neonatal não produz efeitos observáveis. Analisando os resultados encontrados nas duas áreas estudadas (amígdala medial e córtex pré-frontal) podemos verificar que o efeito da estimulação neonatal não provoca uma diminuição geral da densidade neuronal no cérebro. Isto nos leva a crer que as alterações comportamentais geradas pela estimulação aversiva ou manipulação no período neonatal sejam dependentes da plasticidade cerebral da área que modula esse comportamento.

O experimento 5 foi realizado para um melhor entendimento do processo que gerou a diminuição do número de neurônios na amígdala medial, se por apoptose (morte natural da célula) ou necrose. Foi escolhido o dia 5 pós-parto por estar dentro do período no qual fizemos a estimulação aversiva e ser um período com gliogênese, neurogênese e apoptose máximas em áreas do cérebro onde esse processo já foi estudado como no giro denteado (Bayer, 1982; Cameron et al., 1993) e o bulbo olfatório em ratos (Altman, 1969; Kaplan et al., 1985).

Portanto, optou-se por este dia porque provavelmente os processos neuronais estariam melhor evidenciados, e também porque trabalhos anteriores mostraram que estimulação neonatal no dia 2 pós-parto não provocou alterações comportamentais e apenas após o dia 4 pós-natal a estimulação neonatal produziu os efeitos das alterações comportamentais (Levine, 1994). Os resultados mostraram que os animais manipulados possuem uma maior quantidade de células apoptóticas comparados ao grupo intacto. Este resultado indica que a diminuição do número de neurônios na amígdala medial analisada pelo método do disector seria devida a um aumento da apoptose neuronal no período em que o animal está sendo manipulado.

3. CONCLUSÕES

3. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nos experimentos várias questões puderam ser melhor entendidas, como por exemplo:

a) Animais que foram estimulados no período neonatal, tanto manipulados quanto estimulados aversivamente (grupos experimentais) são mais ativos em ambientes novos do que os animais intactos, dado que já era conhecido da literatura em relação a ambientes novos, porém esse trabalho demonstrou que essa característica permanece inalterada mesmo na presença de um predador. Este resultado nos leva a conclusão de que o animal estimulado neonatal quando adulto tem menos medo do que os animais intactos.

b) A estimulação neonatal em machos produz uma diminuição do comportamento sexual, principalmente em animais sexualmente inexperientes, e que com a experiência sexual o animal recupera parcialmente sua atividade sexual.

c) Fêmeas lactantes que foram estimuladas no período neonatal demonstraram um padrão comportamental agressivo ofensivo quando frente a um intruso,, mostrando também um comportamento estereotipado incomum no rato Wistar.

d) Os animais adultos que foram estimulados no período neonatal não mostram alterações de memória.

e) A estimulação neonatal, tanto em machos quanto em fêmeas adultos, testados no teste de nado-forçado, não induz a um estado de desamparo aprendido-depressão.

f) Animais que foram estimulados no período neonatal e analisados na fase peripuberal não mostram as mesmas alterações comportamentais que ocorreram quando os animais foram avaliados quando adultos. Os animais peripuberais, que foram estimulados no período neonatal não exploram mais ambientes novos e mostram tanto medo quanto os animais intactos frente a um predador. Portanto, estimulação neonatal em animais avaliados na fase peripuberal não atua sobre a diminuição do medo e aumento da atividade locomotora.

g) Animais estimulados neonatal, castrados aos 27 dias de idade e analisados na fase adulta, mostram o mesmo padrão comportamental que os animais peripuberais e intactos, ou seja, não mostram diminuição do medo e nem hiperatividade como nos animais adultos não castrados.

h) A estimulação neonatal diminui a densidade neuronal na amígdala medial em machos e fêmeas. Aos 11 e 70 dias de idade, mas aos 35 dias de idade esta diminuição não é observada. No córtex pré-frontal a diminuição do número de neurônios ocorre somente aos 11 dias de idade, mas aos 35 e 70 dias de idade o número de neurônios em animais estimulados neonatal é igual o dos animais intactos.

i) A diminuição da densidade neuronal na amígdala medial gerada pela estimulação neonatal pode estar relacionada a uma maior intensidade de apoptose neuronal durante o período em que está ocorrendo a manipulação ou estimulação aversiva (1-10 dias de idade).

j) A manipulação e a estimulação aversiva neonatal produzem efeitos muito semelhantes na maioria dos experimentos, e quando ocorrem diferenças, a estimulação aversiva mostra um efeito mais pronunciado sobre o comportamento do que o visto pela manipulação. Ao mesmo tempo, os animais estimulados aversivamente mostram um menor grau de recuperação comportamental após a experiência.

l) No conjunto experimental concluímos que o animal que foi estimulado neonatal parece ter uma interpretação inadequada dos estímulos do ambiente, demonstrando pouca interação com o que o cerca.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aloisi, A.M.; Steenbergen, H.L.; van de Poll, N.E.; Farabollini, F. Sex-dependent effects of restraint on nociception and pituitary-adrenal hormones in the rat. *Physiology Behavior*, 55(5): 789-793, 1994.
- Altman, J.; Das, G.D.; Anderson, W.J. Effects of infantile handling on morphological development of the rat brain: anaexploratory study. *Development Psychobiology*, 1:10-20, 1968.
- Altman, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal Comparative Neurology*, 137: 433-458, 1969.
- Andrews, W.W.; Ojeda, S.R. On the feedback actions of estrogen on gonadotropins and prolactin release in infantile female rats. *Endocrinology*, 101: 1517-1523, 1977.
- Anisman, H; Zacharko, R.M. Depression: the predisposition influence of stress. *Behavior and Brain Science*, 5: 89-137, 1993.
- Araki, S., Toran-Allerand, C.D. , Ferin, M.; Vande Wiele, R. L. Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) during maturation in the rat: Ontogeny of regional hypothalamic differences. *Endocrinology*, 97: 693-697, 1975.

- Arenas, A. Selective antagonism of dopamine D1 and D2 receptors does not block the development of behavioral sensitization to cocaine. *Psychopharmacology*, 114(2):239-42, 1994.
- Armario, A.; Perello, A.; Lopez-Calderon, A. Adrenocorticotropin administration increases testosterone secretion in adult male rats. *Life Science*, 29:39(13): 1119-22, 1986.
- Aubert, M.L.; Begeot, M.; Winiger, B.P.; Morel, G.; Sizonenko, P.C.; Dubois, P.M. Ontogeny of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (GnRH) and pituitary GnRH receptors in fetal and neonatal rats. *Endocrinology*, 116: 1565-1576, 1985.
- Bayart, F.; Hayashi, K.T.; Faull, K.F.; Barchas, J.D.; Levine, S. Influence of maternal proximity on behavioral and physiological responses to maternal separation in infant rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Behavior Neuroscience*, 104:98-107, 1990.
- Bayer, S.A. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with H-thymidine autoradiography. *Journal Comparative Neurology*, 190: 87-114, 1980.
- Bayer, S.A.; Yackel, J.W.; Puri, P.S. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* 216: 890-892, 1982.

- Beaulieu, S.; T. Di Paolo, J. C.; Barden, N. Participation of the central amygdaloid nucleus in the response of adrenocorticotropin (ACTH) secretion to immobilization stress: opposing roles of the noradrenergic and dopaminergic systems. *Neuroendocrinology*, 45: 37-46, 1987.

- Becker, R.R.; Iles, D.J. Developmental pattern of androgen-binding protein secretion during the critical period of sexual differentiation. *Archives of Andrology*, 14: 107-114, 1985.

- Bhatnagar, S.; Meaney, M.J. Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. *J. Neuroendocrinology*, 7(2):97-108, 1995.

- Blanchard, D.C.; Blanchard, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annals Review of Psychology*, 39: 43-68, 1988.

- Blanchard, D.C.; Blanchard, R.J.; Tom, P.; Rodgers, R.J. Diazepam handling changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. *Psychopharmacology*, 101: 511-518, 1990.

- Bloom, B.L.; Hodges, W.F.; Caldwell, R.A. A preventive program for the newly separated: initial evaluation. *American Journal Community Psychology*, 10(3):251-64, 1982.

- Bonfoco, E.; Krainc, D.; Ankarcona, M.; Nicotera, P.; Lipton, S.A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. Program National Academic Science U S A., 1:92(16):7162-6, 1995.
- Cameron, H.A.; Woolley, C.S.; McEwen, B.S.; Gould, E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. Neuroscience 56: 337-344, 1993.
- Carter, D.A.; Williams, T.D.; Lightman, S.L. A sex difference in endogenous opioid regulation of the posterior pituitary response to stress in the rat. Journal Endocrinology, 111(2):239-44, 1986.
- Cavalieri, B. Geometria indivisibilibus continuorum. Typis Clemetis Feronij, Bononi. Reprinted (1966) as Geometria degli indivisibili. Unione Tipografico-Editrice Torinese, Torino.
- Charriaut-Marlangue, C.; Margail, I.; Borrega, F.; Plotkine, M.; Ben-Ari, Y. NG-nitro-L-arginine methyl ester reduces necrotic but not apoptotic cell death induced by reversible focal ischemia in rat. European Journal Pharmacology, 29:310(2-3):137-40, 1996.
- Chiappa, S. A.; Fink, G. Releasing factor and hormonal changes in the hypothalamic-pituitary-gonadotrophin and adrenocorticotrophin systems before and after birth and

puberty in male, female and androgenized female rats. *Journal of Endocrinology*, 72: 211-224, 1977.

-Choi, B.H. Density and distribution of excitatory amino acid receptors in the developing human fetal brain: a quantitative autoradiographic study. *Experimental Neurology*, 118(3):284-90, 1992.

-Chrousos, G.P.; Gold, P.W. The concepts of stress and stress system disorders- Overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama*, 267:1244-1252, 1992.

-Clark, H.M. *Anatomy Record* 61: 193,1934.

-Clayton, C.J.; Grosser, B.I.; Stevens, W. The ontogeny of corticosterone and dexamethasone receptors in rat brain. *Brain Research*, 134: 445-453, 1977.

-Consiglio, A.R.; Lucion, A.B. Lesion of hypothalamic paraventricular nucleus and maternal aggressive behavior in rats. *Physiology Behavior*, 59: 591-596, 1996.

-Corbier, P.; Kerdelhue, B.; Picon, R.; Roffi, J. Changes in testicular weight and serum gonadotropin and testosterone levels before, during and after birth in the perinatal rat. *Endocrinology*, 103: 1985-1999, 1978.

- Corbier, P. Sexual differentiation of positive feedback: effect of hour of castration at birth on estradiol-induced luteinizing hormone secretion in immature male rats. *Endocrinology*, 116(1):142-7, 1985.
- Cotman, C.W.; Gómez-Pinilla, F.; Kahle, J.S. Neural plasticity and regeneration. In: *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*, 5. ed. N.Y.: Raven Press, 1994.p.607-626.
- Critchlow, V.; Elwers Bar-Sela, M. Control of the onset of puberty. *Neuroendocrinology*, vol. II:101-162, 1967.
- Cummings, S.; Elde, R.; Ells, J.; Lindall, A. Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. *Journal Neuroscience*, 3(7):1355-68, 1983.
- Curtis, A.L.; Valentino, R.J. Acute and chronic effects of the atypical antidepressant, mianserin on brain noradrenergic neurons. *Psychopharmacology*, 103(3):330-8, 1991.
- d'Amore, A.; Pieretti, S.; Chiarotti, F.; Loizzo, A. Chronic treatment with MIF-1 prevents the painful stimuli threshold elevation induced by neonatal handling in mice. *Peptides.*, 12(6):1291-4, 1991.

- Davis, M. The role of the amygdala in conditioned fear. In: Aggleton, J.P. The amygdala. New York, Wiley- Liss. p- 255-306, 1992.
- De Almeida, R.M.M.; Lucion, A.B. Effects of intracerebroventricular administration of 5-HT agonists on maternal aggression of rats. *European Journal of Pharmacology*, 264: 445-448, 1994.
- Deckwerth, T.L.; Johnson, E.M. Jr. Neurotrophic factor deprivation-induced death. *Annual New York Academy Science*, 28:679:121-31, 1993. Review
- de Kloet, E.R.; Rots, N.Y.; Cools, A.R. Brain-corticosteroid hormone dialogue: slow and persistent. *Cell and Molecular Neurobiology*, 16: 345-356, 1996.
- Denelsky, G.Y.; Denenberg, V.H. Infantile stimulation and adult exploratory behaviour: Effects of handling upon visual variation-seeking. *Animal Behavior*, 15: 568-573, 1967.
- Denenberg, V. H.; Karas, G.G. Interactive effects of age and duration of infantile experience on adult learning. *Psychology Reproductive*, 7:313-322, 1960.
- Denenberg, V.H.; Morton, J.R. C. Effects of environmental complexity and social groupings upon modificaion of emotional behavior. *Journal Comparative Physiology Psychology*, 55: 242-246, 1962.

- a) Denenberg, V.H. The effects of early experience. In: The behavior of domestic animals. Edited by E.S.E. Hafez. London: Bailliere, Tindall & Cox, 109-138, 1962.
- b) Denenberg, V.H. Na attempt to isolate critical periods of development in the rat. *Journal Comparative Physiology Psychology*, 55: 813-815, 1962.
- Denenberg, V.H.; Whimbey, A. E. Infantile stimulation and animal husbandry: A methodological study. *Journal Comparative Physiology Psychology*, 56: 877-878, 1963.
- Denenberg, V.H.; Smith, S.A. Effects of infantile stimulation and age upon behavior. *Journal Comparative Physiology Psychology*, 56: 307-312, 1963.
- Denenberg, V.H.; Kline, N.J. Stimulus intensity vs. Critical periods: A test of two hypotheses concerning infantile stimulation. *Canadian Journal Psychology*, 18: 1-5, 1964.
- Denenberg, V. Critical Periods, stimulus input, and emotional reactivity: a theory of infantile stimulation. *Psychology Review*, 71(5):335-351, 1964.
- Denenberg, V. H. The effects of early experience. In: Hafez, E., ed. The behavior of domestic animals. London: Bailliere, Tindall and Cassell, 1969.

- Denenberg, V. H.; Wyly, M.V.; Burns, J.K.; Zarrow, M.X. Behavioral effects of handling rabbits in infancy. *Physiology Behavior*, 10: 1001-1004, 1973.
- Didier, M.; Bursztajn, S.; Adamec, E.; Passani, L.; Nixon, R.A.; Coyle, J.T.; Wei, J.Y.; Berman, S.A. DNA strand breaks induced by sustained glutamate excitotoxicity in primary neuronal cultures. *Journal Neuroscience*, 1;16(7):2238-50, 1996.
- Dong L.; Josie, D.; Tannenbaum, B.; Caldji, C.; Francis, D.; Freedman, A.; Sharma, S.; Pearson, D.; Plotsky, P.M.; Meaney, M.J. Maternal Care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277:1659-1662, 1997.
- Duvall, E.; Wyllie, A.H.; Morris, R.G. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology*, 56(2):351-8, 1985.
- Fadok, V.A.; Voelker, D.R.; Campbell, P.A.; Cohen, J.J.; Bratton, D.L.; Henson, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal Immunology*, 1:148(7):2207-16, 1992.
- Finger, S.; Almlı, C.R. Brain damage and neuroplasticity mechanisms of recovery or development? *Brain Research Review*, 10: 177-186, 1985.

- Fink, G.; Smith, G.C. Ultrastructural features of the developing hypothalamic-hypophysial axis in the rat. *A. Zellforsch*, 119: 208-226, 1971.

- Fride, E.; Dan, Y.; Feldon, J.; Halevy, G.; Weinstock, M. Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats. *Physiology Behavior*, 37:681-687, 1986.

- Gavrieli, Y.; Sherman, Y.; Ben-Sasson, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal Cell Biology*, 119(3): 493-501, 1992.

- Giese, A.; Groschup, M.H.; Hess, B.; Kretzschmar, H.A. Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathology*, 5(3):213-21, 1995.

- Gloor, P. Consciousness as a neurological concept in epileptology: a critical review. *Epilepsy*, 27 Supplement 2:S14-26, 1986.

- Gogan, F.; Slama, A.; Bizzini-Koutznetzova, B.; Dray, F.; Kordon, C. Importance of perinatal testosterone in sexual differentiation in the male rat. *Journal Endocrinology*, 91: 75-79, 1981.

- González, A.S.; Rodríguez Echandia, R.C.; Fóscolo, M.R.; Fracchia, L.N. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. I. Effects on

forced swim behavior and endocrine responses. *Physiology Behavior*, 47: 735-741, 1990.

-González, A.S.; Rodriguez Echandia, E.L.; Cabrera, R.; Foscolo, M.R. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats:II. Effects on estrous cycle in females. *Physiology Behavior*, 56: 591-595, 1994.

-Gould, E.; Woolley, C.S.; McEwen, B.S. Naturally occurring cell death in the developing dentate gyrus. *Journal Comparative Neurology*, 304: 408-418, 1991.

-Gould, E. The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. *Annals of the New York Academy Of Science*, 743: 73-92, 1994.

-Gray, J.A. Anion selectivity and block of the small-conductance chloride channel on pancreatic duct cells. *American Journal Physiology*, 259(5 Pt 1):C752-61, 1990.

-Greenough, W.T. Experiential modification of the developing brain. *American Scientist*, 63: 37-46, 1975.

-Guillamon, A.; Segovia, S. Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Research Bulletin*, 44: 377-382, 1997.

-Gundersen, H.J.G.; Jensen, E.B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*, 147: 229-263, 1987.

- Harris, V.S.; Sachs, B.D. Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions. *Brain Research*, 86: 514-518, 1975.

- Harris, G.W.; Levine, S. Sexual differentiation of the brain and its experimental control. *Journal physiology*, 163: 42p, 1962 (abstract).

- Hess, J.L.; Denenberg, V.H.; Zarrow, M.X.; Dean Pfeifer, W. Modification of the corticosterone response curve as a function of handling in infancy. *Physiology Behavior*, 4: 109-111, 1969.

- Hilakivi-Clarke, L.A.; Turkka, J.; Lister, R.G.; Linnoila, M. Effects of early postnatal handling on brain β -adrenoceptors and behavior in tests related to stress. *Brain Research*, 542: 286-292, 1991.

- Hines, M.; Allen, L.S.; Gorski, R.A. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Research*, 579: 321-326, 1992.

- Hofer, M.A., The role of nutrition in the physiological and behavioral effects of early maternal separation on infant rats. *Psychosomatic Medicine* 35:350-359, 1973.

- Hompes, P.G.A.; Vermes, I.; Tilders, F.J.H.; Schoemaker, J. In vitro release of LHRH from the hypothalamus of female rats during prepubertal development. *Neuroendocrinology*, 35: 8-12, 1982.
- Honda, K.; Fukuda, S.; Ishikawa, S.E.; Kuzuya, T.; Saito, T. Role of endogenous vasopressin in development of gastric ulcer induced by restraint and water immersion. *American Journal Physiology*, 266(5 Pt 2): R1448-53, 1994.
- Honkaniemi, J. Colocalization of peptide- and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivities with Fos-immunoreactive neurons in rat central amygdaloid nucleus after immobilization stress. *Brain Research*, 11: 598(1-2):107-13, 1992.
- Hotta M.; Shibasaki T.; Masuda A.; Imaki T.; Demura H.; Ohno H.; Daikoku S.; Benoit R.; Ling N.; Shizume K. Ontogeny of pituitary responsiveness to corticotropin-releasing hormone in rat. *Regulated Peptides*, 21:245-252, 1988.
- Hunt, H.F.; Otis, L.S. Early "experience" and its effects on later behavioral processes in rats: I. Initial experiments. *Trans. New York Academy of Science*, 25: 858-870, 1963.
- Isacson, O. On neuronal health. *Trends Neuroscience*, 16(8):306-8, 1993. Review
- Iwata, M. Clinico-pathological studies of long survival ALS cases maintained by active life-support measures. *Advance Experimental Medicine Biololy*, 209:223-5, 1987.

- Jacobs, B.; Schall, M.; Scheibel, A.B. A quantitative dendritic analysis of Wernicke's area. Gender, hemispheric, and environmental factors. *The Journal comparative of neurology*, 237: 97-111, 1993.
- Kant, G.J.; Mougey, E.H.; Pennington, L.L.; Meyerhoff, J.L. Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma beta-endorphin, beta-LPH corticosterone and prolactin. *Life Science*, 26:33(26):2657-63, 1983.
- Kaplan, M.S.; McNelly, N.A.; Hinds, J.W. Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *Journal Comparative Neurology*, 1:239(1):117-25, 1985.
- Kerr, D.E.; Kissinger, L.F.; Gentry, L.E.; Purchio, A.F.; Shoyab, M. Structural requirements of diacylglycerols for binding and activating phospholipid-dependent, Ca⁺⁺-sensitive protein kinase. *Biochem. Biophysics Research Community*, 29:148(2):776-82, 1987.
- Kinsley, B.T.; Levy, C.J.; Simonson, D.C. Prolactin and beta-endorphin responses to hypoglycemia are reduced in well-controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 45(11):1434-40, 1996.
- Kolb, B.; Whishaw, I.Q. Brain plasticity and behavior. *Annals Review of Psychology*, 48: 43-64, 1998.

- Kopin, I.L. Definitions of stress and sympathetic neuronal responses. *Annals. New York Academy Science*, 771:19-30, 1995.
- Levine, S. Infantile experience and consummatory behavior in adulthood. *Journal Comparative Physiology Psychology*, 50: 609-612, 1957.
- Levine, S. Noxious stimulation in infant and adult rats and consummatory behavior. *Journal Comparative Physiology Psychology*, 51: 230-233, 1958.
- Levine, S.; Lewis, G.W. Critical period for the effects of infantile experience on the maturation of a stress response. *Science N.Y.*, 129: 42-43, 1959.
- Levine, S.; Broadhurst, P.L. Genetic and ontogenetic determinants of adult behavior on the rat. *Journal Comparative Physiology Psychology*, 656: 423-428, 1963.
- Levine, S.; Mullins, R. Jr. Estrogen administered neonatally affects adult sexual behaviour in male and female rats. *Science*, 144: 185-187, 1964.
- Levine, S.; Mullins Jr., R. F. Hormonal influences on brain organization in infant rats. *Science*, 152 (3729): 1585-1591, 1966.
- Levine, S.; Haltmeyer, G.C.; Karas, G.G.; Denenber, V.H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiology Behavior* 2:55 –59, 1967.

- Levine, S. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Development Psychobiology*, 24(8):547-58, 1991.
- Levine, S. The psychoendocrinology of stress. *Annals New York Academy Science*, 29:697:61-9, 1993. Review.
- Levine, S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Annals of the New York Academy of Science*, 746: 275-288, 1994.
- Liu, D; Diorio, J.; Tannenbaum, B.; Caldji, C.; Francis, D.; Freedman, A.; Sharma, S.; Pearsen, D.; Plotsky, P.M.; Meaney, M.J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277: 1659-1662, 1997.
- Loo, D.T.; Copani, A.; Pike, C.J.; Whittemore, E.R.; Walencewicz, A.J.; Cotman, C.W. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Program National Academy Science U S A.*, 90(17): 7951-5, 1993.
- Lucion, A .B.; Charchat, H.; Pereira, G. A . M.; Rasia-Filho, A.A. Influence of early postnatal gonadal hormones on anxiety in adult male rats. *Physiology Behavior*, 60: 1419-1423, 1996.

- Lucion, A.B.; De Almeida, R.M.M. On the dual nature of maternal aggression in rats. *Aggressive behavior*, 22: 365-373, 1996.

- MacManus, J.P.; Buchan, A.M.; Hill, I.E.; Rasquinha, I.; Preston, E. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neuroscience Letters* 24;164(1-2):89-92, 1993.

- Maier, S.F; Seligman, M.E.P. Learned helplessness: Theory and evidence. *Journal of Experimental Psychology*, 105:3-46, 1976.

- Majno, G.; Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal Pathology*, 146(1):3-15, 1995. Review

- Mandarin-de-Lacerda, C.A . Métodos quantitativos em morfologia. Universidade do Rio de Janeiro-EDUERJ, p.72-114, 1995.

- Marinari, K.T.; Leshner, A.I.; Doyle, M.P. Menstrual cycle status and adrenocortical reactivity to psychological stress. *Psychoneuroendocrinology*, 1(3):213-8, 1976.

- Mascó, D.H.; Carrer, H.F. Sexual receptivity in female rats after lesions or stimulation in different amygdaloid nuclei. *Physiology Behavior*, 24: 1073-1080, 1990.

- Matsumoto, A.; Arai, Y. Development of sexual dimorphism in synaptic organization in the ventromedial nucleus of the hypothalamus in rats. *Neuroscience Letters*, 24;68(2):165-8, 1986.

- Merchenthaler, I.; Vigh, S.; Petrusz, P.; Schally, A.V. Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *American Journal Anatomy*, 165(4):385-96, 1982.

- McCormick, C.M.; Smythe, J.W.; Meaney, M.J. Prenatal stress and Sex are associated with HPA function and glucocorticoid receptor levels in specific brain areas. *Program International Society Psychoneuroendocrinology*, 23: 169-175, 1992.

- McIntosh, J.; Anisman, H.; Merali, Z. Short-and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res. Development Brain Research*, 113: 97-106, 1999.

- a) Meaney, M.J.; Aitken, D.H.; Bodnoff, S.R.; Iny, L.J.; Tatarewicz, J.E.; Sapolsky, R.M. Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. *Behavior Neuroscience*, 99: 765-770, 1985.

- b) Meaney, M.J.; Sapolsky, R.M.; McEwen, B.S. The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain: I. Ontogeny and autoregulation. *Development Brain Research*, 18 : 159-164, 1985.

- c) Meaney, M.J.; Sapolsky, R.M.; McEwen, B.S. The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. II. Na autoradiographic study. *Development Brain Research*, 18: 165-168, 1985.
- Meaney, M.J.; Aitken, D.H.; Viau, V.; Sharma, S.; Sarrieau, A. Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology*, 50(5):597-604, 1989.
- Meaney, M. J.; Viau, V.; Bhatnagar, S.; Betito, K.; Iny, L.; O'Donnell, D.; Mitchell, J.B. Cellular mechanisms underlying the development and expression of individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response. *Journal Steroid Biochemical Molecular Biology*, 39: 265-274, 1991.
- Meaney, M.J.; Bhatnagar, S.; Larocque, S.; McCormick, C.; Shanks, N.; Sharma, S.; Smythe, J.; Viau, V.; Plotsky, P.M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. *Annals of the New York Academy of Science*, 697:70-85, 1993.
- Meaney, M.J.; Diorio, J.; Francis, D.; LaRocque, S.; O'Donnell, D.; Smythe, J.W.; Sharma, S.; Tannenbaum, B. Environmental regulation of the development of glucocorticoid receptor systems in the rat forebrain. *Annals of the New York Academy of Science* 746:260-273, 1994.

- Meisel, R.L.; Dohanich, G.P.; Ward, I.L. Effects of prenatal stress on avoidance acquisition, open-field performance and lordotic behavior in male rats. *Physiology Behavior*, 22: 527-530, 1979.
- Meyers, W.J. Critical period for the facilitation of exploratory behavior by infantile experience. *Journal Comparative Physiology Psychology*, 55: 1099-1101, 1962.
- Nemeskéri, A.; Halász, B.; Kucz, M. Ontogenesis of the rat hypothalamo-adenohypophyseal system and inherent capacity of the fetal pituitary to differentiate into hormone-synthesizing and releasing cells. In: *The anterior Pituitary gland*, edited by A.S. Bhatnagar, pp 341-354. Raven Press, NY, 1983.
- Núñez, J.F.; Feffé, P.; Garcia, E.; Escoihuela, R.N.; Fernandez-Teruel, B.; Tobenā, A. Postnatal handling reduces emotionality ratings and accelerates two-way active avoidance in female rats. *Physiology Behavior*, 57: 831-835, 1995.
- Ojeda, S.R.; Ramirez, V.D. Short-term steroid treatment on plasma LH and FSH in castrated rats from birth to puberty. *Neuroendocrinology*, 13: 100-114, 1974.
- Ojeda, S.R.; Andrews, W.W.; Advis, J.P.; Smith-White, S. Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocrinology*, 1: 228-257, 1980.

- Olpe, H.; McEwen, B.S. Glucocorticoid binding to receptor-like proteins in rat brain and pituitary: ontogenetic and experimentally induced changes. *Brain Research*, 105: 121-126, 1976.

- Olschowka, J.A.; O'Donohue, T.L.; Mueller, G.P.; Jacobowitz, D.M. Hypothalamic and extrahypothalamic distribution of CRF-like immunoreactive neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology*, 35(4):305-8, 1982.

- Oppenheim, R.W. Cell death during development of the nervous system. *Annals Review Neuroscience*, 14:453-501, 1991. Review.

- Orth, J.M.; Weisz, J.; Ward, O.B.; Ward, I.L. Environmental stress alters the developmental pattern of delta 5-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in Leydig cells of fetal rats: a quantitative cytochemical study. *Biology Reproductive*, 28(3):625-31, 1983.

- Osterlund, M.; Kuiper, G.G.; Gustafsson, J.A.; Hurd, Y.L. Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and beta mRNA within the female rat brain. *Molecular Brain Research*, 54: 175-180, 1998.

- Padoin, M.J.; Lucion, A.B. The effect of testosterone and DOI (1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane) on male sexual behavior of rats. *European Journal of Pharmacology*, 277:1-6, 1995.

- Palluy, O.; Rigaud, M. Nitric oxide induces cultured cortical neuron apoptosis. *Neuroscience Letters*, 12;208(1):1-4, 1996.

- Paxinos, G.; Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego. Academic Press. 1998.

- Pieretti, S.; d'Amore, A.; Loizzo, A. Long-term changes induced by developmental handling on pain threshold: effects of morphine and naloxone. *Behavior Neuroscience*, 105(1):215-8, 1991.

- Plotsky, P. Pathways to the secretion of adrenocorticotrophin: A view from the portal. *J. Neuroendocrinology*, 3:1-9, 1991.

- Pollard, H.; Charriaut-Marlangue, C.; Cantagrel, S.; Represa, A.; Robain, O.; Moreau, J.; Ben-Ari, Y. Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience*, 63(1):7-18, 1994.

- Porsolt, R.D.; LePichon, M.; Jalfre, M. Depression: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730-732, 1977.

- Portera, L.; Cailliau, J. The social costs of anxiety disorders. *Brain Journal Psychology Supplement*,(27):19-22, 1995.

- Powers, R.E.; De Souza, E.B.; Walker, L.C.; Price, D.L.; Vale, W.W.; Young, W.S. 3d, Corticotropin-releasing factor as a transmitter in the human olivocerebellar pathway. *Brain Research*, 14;415(2):347-52, 1987.
- Quirk, G.J.; Repa, C.; LeDoux, J.E. Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron*, 15: 1029-1039, 1995.
- Raff, M.C.; Barres, B.A.; Burne, J.F.; Coles, H.S.; Ishizaki, Y.; Jacobson, M.D. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*, 29;262(5134):695-700, 1993. Review
- Ramón Y Cajal, S. Degeneration and regeneration of the nervous system. London: Oxford Univ. Press, 1928.
- Rebouças, R.C.R.; Schmidek, W.R. Handling and isolation in three strain of rats affect open field, exploration, hoarding and predation. *Physiology Behavior*, 62: 1159-1164, 1997.
- Rhoda, J.; Corbier, P.; Roffi, J. Gonadal steroid concentrations in serum and hypothalamus of the rat at birth: aromatization of testosterone to 17 beta-estradiol. *Endocrinology*, 114: 1754-60, 1984.

- Richards, W.J.; Leslie, G.R. Food and water deprivation as influences on exploration. *Journal Comparative Physiology Psychology*, 55: 834-837, 1962.
- Rickmann, M.; Amaral, D.G.; Cowan, W.M. Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus. *Journal Comparative Neurology* 264: 449-479, 1987.
- Rivier, C.L.; Plotsky, P.M. Mediation by corticotropin releasin factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. *Annals Review Physiology*, 48: 475-494, 1986.
- Routtenberg, A.; Strop, M.; Jerdan, J. Response of the infant rat to light prior to eyelid opening: Mediation by the superior colliculus. *Development Psychobiology* 11:469-478, 1978.
- Sapolsky, R.M.; Meaney, M.J. Maturatuion of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Research*, 11: 65-76, 1986.
- Sapolsky, R.M. The physiological relevance of glucocorticoid endangerment of the hippocampus. *Annals New York Academy Science*, 30;746:294-304; discussion 304-7, 1994. Review.

- Sapolsky, R.M. The importance of a well-groomed child., *Science* 277:1620-1621, 1997.
- Schlessinger, A.R.; Cowan, W.M.; Gottlieb, D.I. An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *Journal Comparative Neurology* 159: 149-176, 1975.
- Schulz, C.; Lehnert, H. Activation of noradrenergic neurons in the locus coeruleus by corticotropin-releasing factor. A microdialysis study. *Neuroendocrinology*, 63(5):454-8, 1996.
- Segarra, A.C.; Luine, V.N.; Strand, F.L. Sexual behavior of male rats is differentially affected by timing of perinatal ACTH administration. *Physiology Behavior*, 50: 689-697, 1991
- Shinoda, K.; Nagano, M.; Osawa, Y. Neuronal aromatase expression in preoptic, strial, and amygdaloid regions during late prenatal and early postnatal development in the rat. *Journal Comparative Neurology*, 343: 113-129, 1994.
- Siegel, S. *Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento*. São Paulo: Mc Graw-Hill, p. 106-219, 1975.

- Simerly, R.B.; Chang, C.; Muramatsu, M.; Swanson, L.W. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *Journal Comparative Neurology*, 294: 76-95, 1990.

- Slob, A.K.; Ooms, M.P.; Vreeburg, J.T.M. Prenatal and early postnatal Sex differences in plasma and gonadal testosterone and plasma luteinizing hormone in female and male rats. *Journal Endocrinology*, 87: 81-87, 1980.

- Smock, T.; Arnold, S.; Albeck, D.; Emerson, P.; Garritano, J.; Burrows, K.; Derber, W.; Sanon, C.; Marrs, K.; Weartheary, H. e Kruse, K. A peptidergic circuit for reproductive behavior. *Brain Research*, 598: 138-142, 1992.

- Smythe, J.W.; McCormick, C.M.; Rochford, J.; Meaney, M.J. The interaction between prenatal stress and neonatal handling on nociceptive response latencies in male and female rats. *Physiology Behavior*, 55(5): 971-974, 1994.

- Stock, G. Long-term application of haloperidol: effects on dopamine and acetylcholine receptors. *Int. Pharmacopsychology*, 16(3):144-53, 1981.

- Suchecki, D.; Neto, J.P. Prenatal stress and emotional response of adult offspring. *Physiology Behavior*, 49: 423-426, 1991.

- Swanson, L.W.; Petrovich, G.D. What is the amygdala? *TINS*, 21: 323-331, 1998.

- Swanson, H.E.; Van der Werff tem Boxch, J.J. The "early androgen" syndrome: differences in response to pre-natal and post-natal administration of various doses of testosterone propionate in female and male rats. *Acta endocrinology*, 47: 37-50, 1964.
- Swanson, L.W.; Sawchenko, P.E.; Lind, R.W. Regulation of multiple peptides in CRF parvocellular neurosecretory neurons: implications for the stress response. *Program Brain Research*, 68: 169-190, 1986.
- Szabo, K.; Csanyi, K. The vascular architecture of the developing pituitary-median eminence complex in the rat. *Cell Tissue Research*, 224: 563-577, 1982.
- Szeligo, F.; Leblond, C.P. Response of the three main types of glial cells of cortex and corpus callosum in rats handled during suckling or exposed to enriched, control and impoverished environments following weaning. *Journal Comparative Neurology*, 15;172(2):247-63, 1977.
- a)Takahashi, L.K.; Turner, J.G.; Kalin, N.H. Prenatal stress alters brain catecholaminergic activity and potentiates stress-induced behavior in adult rats. *Brain Research*, 574: 131-137, 1992.
- b)Takahashi, L. K.; Haglin, C.; Kalin, N.H. Prenatal stress potentiates stress-induced behavior and reduces the propensity to play in juvenile rats. *Physiology Behavior* 51:319-323, 1992.

- Tejedor-Real P, Costela C, Gibert-Rahola J. Neonatal handling reduces emotional reactivity and susceptibility to learned helplessness. Involvement of catecholaminergic systems. *Life Science* 1998;62(1):37-50

- Tucker, D.; Johnson, A. Influence of neonatal handling and blood pressure, locomotor activity and preweaning heart rate in spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Development Psychobiology*, 17: 587-600, 1984.

- Valentino, R.J.; Foote, S.L. Brain noradrenergic neurons, corticotropin-releasing factor, and stress in: neural and endocrine peptides and receptors. Ed. Terry W. Moody, Plenum Press, NY, 1986.

- vom Saal, F.S.; Bronson, F.H. Sexual characteristics of adult female mice are correlated with their blood testosterone levels during prenatal development. *Science*, 9;208(4444):597-9, 1980.

- Wakshlak, A.; Weinstock, M. Neonatal handling reverses behavioral abnormalities induced in rats by prenatal stress. *Physiology Behavior*, 48: 289-292, 1990.

- Walker, C.C.; Perrin M.; Vale W.; Rivier C. Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology*, 118:1445-1451, 1986

- Walker S. J.; Vrana, K.E. Pituitary corticotroph function during the stress hyporesponsive period in neonatal rats. *Neuroendocrinology*, 57: 1003-1010, 1993.

- Ward, I.L. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science*, 175: 82-84, 1972.

- Ward, I.L.; Ward, O.B.; Winn, R.J.; Bielawski, D. Male and female sexual behavior potential of male rats prenatally exposed to the influence of alcohol, stress or both factors. *Behavior neuroscience*, 108(6): 1188-1195, 1994.

- Whalen, R.E.; Nadler, R.D. Suppression of the development of female mating behavior by estrogen administered in infancy. *Science*, 141: 273-274, 1963.

- Whalen, R.E. Hormone-induced changes in the organization of sexual behavior in the male rat. *Journal Comparative Physiology Psychology*, 57:175-182, 1964.

- Wiener, S.G.; Bayart, F.; Faull, K.F.; Levine, S. Behavioral and physiological responses to maternal separation in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Behavior Neuroscience*, 104: 108-115, 1990.

- Wood, R.J.; Newman, S.W. Hormonal influence on neurons of the mating behavior pathway in male hamsters. In: Micevych, P.E. e Hammer Jr, R.P. *Neurobiological Effects of Sex steroid hormones*. New York, Cambridge.p.3-39, 1995.

- Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 10;284(5756):555-6, 1980.
- Young, W.C. The hormones and mating behavior. In: Young, W.C. (Ed.) *Sex and internal secretions*. Vol 2. Baltimore, Md.: Williams e Wilkins Co., London: Bailliére Tindal e Cox. p. 1173-1239, 1961.
- Young, W.C.; Goy, R.W.; Phoenix, C.H. Hormones and sexual behavior. *Science*, 143: 212-218, 1964.
- Zilles, K. Neuronal plasticity as an adaptative property of the central nervous system. *Annals of Anatomy*, 174: 383-391, 1992.
- Zimbardo, P.G.; Montgomery, K.C. Effects of "free-environment" rearing upon exploratory behavior. *Psychology Reproductive*, 3: 589-594, 1957.
- Ziv, I.; Melamed, E.; Nardi, N.; Luria, D.; Achiron, A.; Offen, D.; Barzilai, A. Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons-a possible novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 28;170(1):136-40, 1994.