

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

ESTRESSE NEONATAL, EXPRESSÃO DO MEDO E
SISTEMA DOPAMINÉRGICO EM RATOS

Clarice Sandi Madruga

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Neurociências
da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre
em Neurociências

Porto Alegre, 2003

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

ESTRESSE NEONATAL, EXPRESSÃO DO MEDO E
SISTEMA DOPAMINÉRGICO EM RATOS

Dissertação de Mestrado

Clarice Sandi Madruga

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Porto Alegre, 2003

"Se o cérebro humano fosse simples suficiente para que pudéssemos entendê-lo, seríamos tão estúpidos que não o entenderíamos".

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Aldo Bolten Lucion, por me receber neste programa de pós-graduação e mostrar a importância do estudo do estresse neonatal, motivando-me a seguir essa área de pesquisa.

À professora Matilde Achaval, que prestou uma ajuda inestimável na realização da técnica de imunistoquímica além de servir como um grande modelo de cientista.

Ao Professor Gilberto Sanvito pelos inúmeros esclarecimentos e pelo incentivo.

À minha mãe, por prestar o eficiente serviço “tele-mãe” !

Ao meu pai, por sempre reforçar meu interesse pelo estudo dando-me sempre apoio e incentivo.

Aos amigos do laboratório: Charlis, Cármen, Anelise, Márcio, Ana Lúcia, Gabriela S., Gabriela P. e Elisa, que proporcionaram a mim dois anos de um ambiente inigualável de trabalho, com muito espírito de equipe, bom humor e amizade.

As amigas e colegas de laboratório Isabel e Márcia por alimentarem o meu gosto pela ciência sendo uma constante fonte de inspiração, além de se mostrarem grandes companheiras nos momentos difíceis.

Ao André Rosito, que durante todo o tempo me ajudou, ouviu e amparou nos momentos difíceis.

A Sheila, pelo envolvimento precioso na realização dos experimentos comportamentais desta pesquisa.

Ao André Luzardo, por ter me despertado o amor pela ciência.

Ao Léder por ter pacientemente me ensinado o método da densitometria óptica.

À equipe do Laboratório de Histofisiologia Comparada, pelo apoio e companheirismo, particularmente à Erica, que me apresentou a técnica de imunistoquímica.

À professora Maria Flávia pelos esclarecimentos sobre a técnica Imunoistoquímica.

À prestativa Maria, secretária deste curso.

As agências de fomento que financiaram direta ou indiretamente esta pesquisa: CAPES, CNPQ, FAPERGS, FAPESP e FINEP.

Aos eficientes bioteristas de nosso laboratório Tabajara e Diego, pois sem eles, os sujeitos desta pesquisa não sobreviveriam.

Aos próprios sujeitos desta pesquisa: os ratos!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Estresse Neonatal	2
1.1.1 Modelos de Estresse Neonatal	4
1.1.1.1 Manipulação Neonatal	5
1.1.1.1.1 Efeitos Neuroendócrinos da Manipulação	6
1.1.1.1.2 Efeitos Comportamentais da Manipulação	8
1.1.1.2 Separação Materna	10
1.1.1.2.1 Efeitos Neuroendócrinos da Separação	12
1.1.1.2.2 Efeitos Comportamentais da Separação	15
1.2 Sistema Dopaminérgico	17
1.2.1 Sistema Dopaminérgico Mesocorticolímbico	19
1.2.1.1 Complexo SN-VTA	21
1.2.1.1.1 Citoarquitetura do Complexo SN-VTA	23
1.2.2 Sistema Dopaminérgico e Estresse	25
1.2.2.1 Sistema Dopaminérgico e Estresse Neonatal	28

1.3 Medo	29
1.3.1 Medo Inato e Adquirido	30
1.3.1.1 Condicionamento Clássico e Medo Aprendido	31
1.3.2 Neurobiologia do Medo Aprendido	35
1.4 Estresse Neonatal, Sistema Dopaminérgico e Expressão do Medo	38
2 OBJETIVOS	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Animais	44
3.2 Tratamento	45
3.3 Desenho Experimental	46
3.4 Análise Comportamental	47
3.4.1 Medo Aprendido	48
3.4.2 Medo Inato	50
3.5 Instrumentos	50
3.5.1 Caixa de Condicionamento	50
3.5.2 Campo Aberto	52
3.6 Imunoistoquímica	53
3.6.1 Preparação do Tecido	53
3.6.2 Técnica Imunoistoquímica	54
3.6.3 Densitometria Óptica	56
3.7 Análise Estatística	59
4 RESULTADOS	60
4.1 Resultados Comportamentais	61
4.1.1 Medo Aprendido	61
4.1.2 Medo Inato	71

4.2 Controle dos Pesos	80
4.3 Resultados da Imunoistoquímica	81
4.3.1 Densitometria Óptica	81
4.3.2 Imagens Histológicas	83
5 DISCUSSÃO	87
5.1 Análise Comportamental	89
5.1.1 Medo Aprendido	89
5.1.2 Medo Inato	93
5.1.3 Análise Geral do Comportamento	95
5.2 Análise Imunoistoquímica	97
6 CONCLUSÕES	102
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1	Protocolo da Técnica de Imunoistoquímica	54
Tabela 2	Peso médio (Kg) dos grupos controle, manipulado e separado nas idades: 21, 46, 60 e 90 dias	79
Figura 1	Esquema da síntese das catecolaminas	18
Figura 2	Algumas vias dopaminérgicas no sistema nervoso de ratos	19
Figura 3	Ilustração do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico	21
Figura 4	Esquema de ilustração do desenho experimental da pesquisa	47
Figura 5	Ilustração do esquema de pareamentos de estímulos no Medo Condicionado	49
Figura 6	Disposição dos equipamentos do medo condicionado	51
Figura 7	Monitor usado no medo condicionado	51
Figura 8	Caixa de Condicionamento	52
Figura 9	Campo Aberto	52
Figura 10	Exemplificação da quantificação da DO de uma AOI na parte compacta da substância nigra.	58
Figura 11	Inserção da AOI no background e mensuração	58

	da densidade óptica	
Figura 12	Esquema ilustrando os procedimentos para técnica de Imunoistoquímica.	59
Figura 13	Latência de imobilização dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	64
Figura 14	Latência da extinção do condicionamento dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	64
Figura 15	Duração da imobilização dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	65
Figura 16	Freqüência da imobilização dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	65
Figura 17	Duração do comportamento escanear dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	66
Figura 18	Freqüência do comportamento escanear dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	66
Figura 19	Duração do comportamento <i>rearing</i> dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	67
Figura 20	Freqüência do comportamento <i>rearing</i> dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	67
Figura 21	Duração do comportamento cheirar dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	68
Figura 22	Freqüência do comportamento cheirar dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	68

Figura 23	Duração do comportamento autolimpeza dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	69
Figura 24	Freqüência do comportamento autolimpeza dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	69
Figura 25	Duração do comportamento deitar dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	70
Figura 26	Latência do comportamento deitar dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	70
Figura 27	Defecação dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	71
Figura 28	Índice de coincidências entre imobilização e estímulo neutro dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.	71
Figura 29	Duração da locomoção dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto.	73
Figura 30	Freqüência da locomoção dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto.	73
Figura 31	Duração do comportamento escanear dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto.	74
Figura 32	Freqüência do comportamento escanear dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto.	74

Figura 33	Duração do comportamento <i>rearing</i> dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto.	75
Figura 34	Freqüência do comportamento <i>rearing</i> dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto.	75
Figura 35	Duração do comportamento autolimpeza dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto.	76
Figura 36	Freqüência do comportamento autolimpeza dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto.	76
Figura 37	Duração do comportamento cheirar dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto.	77
Figura 38	Freqüência do comportamento cheirar dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto.	77
Figura 39	Latência de entrada no centro do campo aberto dos grupos controle, manipulado e separado.	78
Figura 40	Freqüência de entrada no centro do campo aberto dos grupos controle, manipulado e separado.	78
Figura 41	Tempo de permanência no centro do campo aberto dos grupos controle, manipulado e separado.	79
Figura 42	Defecação dos grupos controle, manipulado e separado no campo aberto.	79
Figura 43	Densidade óptica na área tegmental ventral dos grupos controle, manipulado e separado.	82
Figura 44	Densidade óptica na substância nigra dos grupos controle, manipulado e separado.	82

Figura 45	Fotomicrografia de secções coronais da substância nigra (2x) de ratos machos pertencentes aos grupos Controle (A), Manipulado (B) e Separado (C). Técnica Imunoistoquímica para demonstração de TH.	83
Figura 46	Fotomicrografia de secções coronais da substância nigra (10x) de ratos machos pertencentes aos grupos (A)Controle, (B)Manipulado, (C)Separado. Técnica Imunoistoquímica para demonstração de TH.	84
Figura 47	Fotomicrografia de secções coronais da área tegmental ventral (2x) de ratos machos pertencentes aos grupos (A)Controle, (B)Manipulado, (C)Separado. Técnica Imunoistoquímica para demonstração de TH.	85
Figura 48	Fotomicrografia de secções coronais da área tegmental ventral (10x) de ratos machos pertencentes aos grupos (A)Controle, (B)Manipulado, (C)Separado. Técnica Imunoistoquímica para demonstração de TH.	86

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
BLA	Núcleo Basolateral da Amígdala
BZ	Benzodiazepínico
Ce	Núcleo Central da Amígdala
CLi	Núcleo Caudal Linear
CRH	Hormônio de Liberação de Corticotrofina
EC	Estímulo Condicionado
EI	Estímulo Incondicionado
EN	Estímulo Neutro
GABA	Ácido γ -aminobutírico
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IF	Núcleo Interfascicular
L-dopa	L-di-hidroxifenilalanina
NE	Noradrenalina
PBP	Núcleo Parabraquial Pigmentado
PN	Núcleo Paranigral
PNMT	Feniletanolamina N-Metiltransferase
PVN	Núcleo Paraventricular
RC	Resposta Condicionada
RLi	Núcleo Rostral Linear
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	Ácido Ribonucléico Mensageiro
SN	Substância Nigra
SNC _o	Parte Compacta da Substância Nigra
SNL	Substância Nigra Lateral
SNRE	Substância Nigra Reticulada
SN-VTA	Complexo: Área Tegmental Ventral e Substância Nigra
TH	Tirosina Hidroxilase
VTA	Área Tegmental Ventral
VTAR	Área Tegmental Ventral Rostral

RESUMO

A estimulação neonatal tem sido utilizada 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 duradouras. Buscou-se estudar os efeitos do estresse neonatal sobre duas abordagens: comportamental e imunoistoquímica. Na primeira, foram avaliados em ratos adultos (90-110 dias) dois paradigmas de medo: inato (campo aberto, N=48) e aprendido, (condicionamento clássico N=48); enquanto na segunda abordagem realizou-se a técnica imunoistoquímica (N=15) na substância nigra compacta (SNCo) e área tegmental ventral (VTA) para detecção da enzima precursora da dopamina, a tirosina hidroxilase (TH). Foram utilizados ratos da variedade Wistar, que do 1º ao 10º dia de vida foram submetidos a 3 tipos de intervenção: manipulação (retirados do ninho por 3min sendo tocados gentilmente por 1 min); separação (retirados do ninho por 3h, e mantidos a temperatura de 33°C); e grupo controle (sem intervenções do experimentador ou do tratador). O condicionamento clássico (treino) foi constituído por 10 pareamentos de 1 estímulo incondicionado (EI, choque elétrico -0,8mA) com 2 estímulos condicionados ou neutros (EC, som e luz) em 2 sessões de 5 pareamentos cada. A duração de cada emissão do EC foi de 5s sendo no último segundo associada ao EI. O teste foi realizado 24h após o treino, e consistiu de emissões de EC com mesma duração e intervalo por um período total de 30 min. No experimento 2, foi utilizado um campo aberto de 1m² no qual os ratos permaneceram por 5 min. Em ambos experimentos os comportamentos eram registrados em vídeo e analisados através do programa Noldus®. Os resultados (X±EPM) foram analisados por uma ANOVA, *post-hoc* Newman Keuls ou Kruskal Wallis *post-hoc* Dunn ($p < 0,05$). Nos experimentos comportamentais foram observados os seguintes resultados: no medo aprendido houve diminuição da duração (s) do comportamento de imobilização (491±54); da duração de rearing (58±13) e da latência para extinção do condicionamento do grupo manipulado (591±434) comparado ao controle (718±73; 22±6; 1020±843 respectivamente) e no campo aberto houve aumento da duração e frequência da locomoção e rearing (97.6±8; 4.3±1 e 64.3±5; 31±2), diminuição da duração de autolimpeza (4.2±1) e aumento da frequência

de entradas no centro do campo aberto (4.3 ± 0.8) no grupo manipulado comparado ao controle (69 ± 7 ; 30 ± 3 e 48 ± 6 ; 21.5 ± 2 ; 19 ± 5 ; 2.2 ± 0.6 , respectivamente). Na análise Imunoistoquímica não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos quanto imunomarcção de TH nas áreas estudadas. Foi confirmada a diminuição da inibição comportamental no campo aberto como consequência da manipulação. A manipulação neonatal também reduziu as respostas do medo condicionado, ratos manipulados no período neonatal expressam, quando adultos, menor expressão de medo aprendido e tem a extinção da aprendizagem aversiva mais acelerada. Curiosamente não foram observados efeitos da separação materna sobre as repostas de medo inato ou aprendido. Embora a dopamina do sistema mesocorticolímbico module as respostas comportamentais alteradas, nenhum dos modelos de intervenção estudados afetaram a intensidade de marcação deste neurotransmissor.

Introdução



1 INTRODUÇÃO

1.1. Estresse Neonatal

A plasticidade cerebral perinatal aumenta a vulnerabilidade a experiências adversas precoces, levando a desenvolvimento e comportamento anormais. Embora uma série de investigações epidemiológicas tenham associado complicações peri e neonatais com comportamento adulto anormal, o entendimento dos mecanismos subjacentes permanecem rudimentares (ANAND e SCALZO, 2000). A qualidade do ambiente familiar na infância pode servir como a maior fonte de vulnerabilidade na vida adulta, indivíduos que são vítimas de abuso físico ou sexual têm maiores riscos de apresentarem doenças mentais quando adultos. Negligência emocional persistente ou condições adversas precoces levam a um aumento do risco de depressão e desordens de ansiedade a um nível comparável aos observados nos casos de abuso (FRANCIS et al., 1999). Estímulos ambientais durante estágios precoces da vida podem influenciar o desenvolvimento de um organismo, resultando em mudanças permanentes no comportamento e fisiologia na idade adulta (MEERLO et al., 1999).

No rato, durante as primeiras semanas de vida, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) tem sua responsividade consideravelmente diminuída, a glândula adrenal é menos sensível ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), e as concentrações, tanto basais quanto

induzidas por estresse, de corticosterona, ACTH e hormônios secretados pelo hipotálamo são diminuídas. Tanto a imaturidade estrutural do sistema nervoso, quanto este processo inibitório ativo observado, parecem estar adjacentes a uma hiporresponsividade global. (ROSENFELD et al., 1992). A concentração plasmática desses hormônios cresce paulatinamente até a puberdade (WALKER et al., 1986). Ao longo das últimas décadas, as conclusões dos trabalhos a respeito da atividade funcional do eixo HPA de ratos neonatos expostos a estímulos estressores têm mudado dependendo das metodologias experimentais empregadas (DALLMAN, 2000). Inicialmente, foi demonstrado com as metodologias disponíveis que o sistema hipotálamo-hipófise-adrenal de ratos neonatos era não-responsivo a estímulos ambientais e que não ocorria ainda o mecanismo de retroalimentação negativo (HENNING, 1978). Mais tarde verificou-se que alguns estímulos eram capazes de ativar o eixo, e também se demonstrou que o hipotálamo era sensível aos glicocorticóides adrenais circulantes (WALKER et al., 1986). Trabalhos mais recentes têm descrito que o eixo HPA de ratos neonatos é responsivo a estímulos ambientais de uma maneira peculiar, diferente de um animal adulto (DENT et al., 2000). Portanto, uma hipótese razoável a ser analisada é a de que as respostas do eixo aos estímulos ambientais no período neonatal podem induzir alterações no sistema nervoso desses animais, sendo essa a base para as alterações comportamentais e de reatividade a estímulos estressantes na vida adulta.

Estudos pré-clínicos demonstram que o estresse precoce pode alterar o desenvolvimento do eixo HPA e os sistemas hipotalâmicos e extra-hipotalâmicos de hormônio de liberação de corticotrofina (CRH), GABA/benzodiazepínicos, e monoaminérgicos (noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico). O estresse precoce também tem sido citado como promotor de alterações estruturais e funcionais em regiões encefálicas similares às aquelas observadas em adultos com depressão, sugerindo que o modelo experimental de estresse neonatal pode ser um instrumento importante para o entendimento de patologias psiquiátricas, como por exemplo, à depressão maior (LEVINE, 1962). Todavia, os efeitos de longo prazo do estresse precoce podem ser modulados por fatores genéticos e a qualidade do ambiente de cuidado subsequente. Estes efeitos também podem ser prevenidos ou revertidos

através de uma variedade de intervenções farmacológicas (KAUFMAN, et al., 2000).

1.1.1 Modelos de Estresse Neonatal

Muitos pesquisadores têm tentado desenvolver modelos animais de experiências estressantes na infância. Os modelos de manipulação neonatal e separação materna têm sido freqüentemente propostos (LEVINE, 1962; PLOTSKY e MEANEY, 1993^a; 1993b; DENENBERG, 1964; MEERLO et al., 1999; LADD et al., 2000; LEHMANN et al., 2002; PAPAIOANNOU, et al., 2002). Estudos com modelos de estresse precoce podem ser uma importante ferramenta usada para investigar as interações entre os genes e o ambiente na determinação da sensibilidade ao estresse de cada indivíduo (MEERLO et al., 1999). Modelos de experiências precoces aversivas como dor repetitiva, septicemia ou separação materna em roedores e outras espécies têm levado a múltiplas alterações no encéfalo adulto, correlacionados com fenômenos comportamentais específicos, dependendo do período e natureza do insulto (ANAND et al., 2000). Enfim, eventos precoces estressantes durante o período hiporresponsivo ao estresse podem influenciar tanto no comportamento emocional quanto na maturação do eixo HPA do rato (LUCION, 1997). Os efeitos de intervenções no período pós-natal constituem a base da vulnerabilidade do indivíduo a doenças decorrentes do estresse (KAUFMAN et al., 2000).

1.1.1.1 Manipulação Neonatal

A estimulação neonatal por manipulação tem sido utilizada 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 (LEVINE, 1962; DENENBERG, 1964; MEERLO et al., 1999).

A manipulação é aparentemente uma intervenção branda na maioria dos experimentos. Em ratos, o procedimento usual é afastar os filhotes do ninho por 3 – 15 minutos, neste caso, a manipulação não representa uma privação materna, visto que ao longo do dia as mães normalmente ficam longe do ninho por períodos de 20 - 25 minutos (CALDJI et al., 1998). Esta intervenção pode incluir ou não a estimulação tátil dos filhotes feita pelo experimentador, e é realizada geralmente durante as duas primeiras semanas de vida do animal, durante o período hiporresponsivo.

Além da própria estimulação tátil dos filhotes, a manipulação neonatal rompe a relação mãe-filhote. Vários estudos, inclusive resultados preliminares em nosso laboratório, mostraram que os efeitos da manipulação pós-natal poderiam ser mediados por alterações da interação mãe-filhote (LEVINE, 1994; LIU et al., 1997; CALDJI et al., 1998; TODESCHINI, 2002). Assim, os efeitos comportamentais e neuroendócrinos observados nos filhotes são provavelmente devidos à estimulação da mãe através do comportamento de lambar os filhotes e ficar sobre o ninho. A manipulação executada pelo experimentador seria um estímulo para aumentar o comportamento maternal.

Acredita-se que a manipulação pode ter um efeito *per se* como também pode induzir a um aumento do comportamento maternal. Os efeitos comportamentais e neuroendócrinos poderiam ser devidos tanto à ação direta da manipulação, embora essa manipulação acompanhada de uma breve separação da mãe parece não acionar o eixo HPA do filhote, quanto à alteração do comportamento maternal, em que a mãe estimula com maior intensidade os filhotes que são manipulados (LUCION, 1997).

1.1.1.1.1 Efeitos Neuroendócrinos da Manipulação

Ratos manipulados no período neonatal mostram quando adultos uma série de alterações neuroendócrinas. A principal delas parece ser a redução na liberação de ACTH e corticosterona em resposta a eventos estressores externos, bem como o retorno mais rápido da corticosterona aos níveis basais (LIU et al., 1997; MEANEY et al., 1988; MEANEY et al., 1989; PLOTSKY et al., 1993; VALEE et al., 1997). Plotsky e Meaney (1993a) relataram que estes animais apresentam também um aumento no *feedback* negativo dos glicocorticóides circulantes, relacionado a um aumento na concentração de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) de receptores de glicocorticóides no hipocampo e no córtex frontal, locais envolvidos no controle inibitório da síntese de CRH nos neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo. Desta forma, ratos manipulados têm uma redução da concentração de RNAm de CRH no PVN hipotalâmico e na eminência mediana. Ratos manipulados também possuem menor concentração de RNAm de receptores de CRH na amígdala central e uma menor concentração de CRH no *locus ceruleus* (FRANCIS et al., 1999 e LADD et al., 1998) também é observada após estresse agudo de contenção. A intervenção por manipulação também gera um aumento de receptores GABA_A na região do corpo de células noradrenérgicas do *locus ceruleus* e do núcleo da estria terminal, assim como um aumento dos níveis de receptores benzodiazepínicos na amígdala central, *locus ceruleus* e núcleo da estria terminal. Todos estes dados apontam para uma menor responsividade a situações de estresse.

Além disso, ratos manipulados também apresentaram menor perda de células hipocâmpais provocada pela idade avançada, possivelmente como consequência das menores concentrações de glicocorticóides em estresse, comum causador desta perda, levando a melhora de sua performance em tarefas cognitivas mediadas pelo hipocampo (MEANEY et al., 1991).

Aguiar e colaboradores (1997) observaram que a manipulação neonatal não foi capaz de alterar o número de corticotrófos, e trabalhos prévios no nosso laboratório mostraram que esta intervenção também não alterou o número de neurônios tirosina-hidroxilase (TH) imunoreativos nos núcleos hipotalâmicos paraventricular, arqueado e periventricular (HERMEL et al., 2001), levando à conclusão de que estas projeções de neurônios dopaminérgicos não estão alteradas. Considerando-se que as concentrações basais de hormônios do estresse de ratos manipulados no período neonatal não são diferentes dos animais controles (MEANEY et al., 1996), possivelmente as alterações estruturais no sistema nervoso central se encontrem em áreas que modulam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (CALDJI et al., 1998a; 2000a; KAUFMAN et al., 2000).

Alguns trabalhos colocam que a manipulação neonatal também promove um aumento do ganho de peso corporal (SCHANBERG *E* FIELD, 1987; KUHN *E* SCHANBERG, 1998). Evidências sugerem que este aumento provavelmente depende do comportamento da mãe com o filhote e não apenas da amamentação, visto que se for mantida a amamentação, mas impedido o comportamento maternal, não haverá o ganho de peso corporal (KUHN *E* SCHANBERG, 1998). Estes experimentos demonstram que o comportamento da mãe de lambar os filhotes aumenta a atividade da enzima ornitina descarboxilase promovendo um incremento no crescimento dos filhotes.

1.1.1.1.2 Efeitos Comportamentais da Manipulação

Plotsky e Meaney (1993) relataram que ratos manipulados 15 minutos por dia durante as primeiras três semanas de vida possuem menor reatividade ao estresse quando adultos. Segundo os autores, estes animais demonstram menos medo em ambientes novos. Cabe aqui destacar que muitas vezes a palavra medo será utilizada quando se trata da resposta destes

animais frente a estressores externos e internos, tal denominação, embora seja de fundo subjetivo e pouco “quantificável”, é largamente utilizada pelos pesquisadores desta área, podendo ser definida por uma menor inibição comportamental frente a estímulos internos ou do meio, juntamente com a diminuída reatividade do eixo HPA anteriormente citada. Estudos mostraram que ratos manipulados precocemente também apresentaram uma aprendizagem de esquiva inibitória ativa aumentada (ESCORIHUELA et al., 1994). Meerlo e colaboradores (1999) realizaram uma série de experimentos comportamentais em ratos submetidos à manipulação de 15 minutos nas primeiras três semanas de vida. Seus dados apontam diferenças entre animais manipulados e controles no tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado e nas durações de imobilização, *rearing* e *sniffing* (cheirar) no teste de medo condicionado. Meerlo e colaboradores (1999) não observaram alterações na atividade exploratória no campo aberto nem no teste *shock prod defensive burying*, que avalia as estratégias utilizadas para lidar com estímulos estressores. Reunidos, os dados sugerem que quando adultos, os ratos manipulados não diferem em sua maneira geral de enfrentar estressores, mas possuem uma ansiedade induzida pelo estresse fortemente atenuada. Os autores também colocam que, conforme seus dados, quanto mais estressante for a ameaça, mais possível é detectar diferenças comportamentais entre ratos manipulados e controles.

Papaioannou e colaboradores (2002) submeteram animais manipulados no período neonatal à estresse por nado forçado agudo e crônico. Foram detectadas diferenças de gênero nos efeitos da manipulação. Ratos machos manipulados mostraram menores tempos de imobilização no estresse por nado forçado crônico, enquanto o oposto foi observado em fêmeas submetidas às mesmas intervenções no período neonatal. Os autores concluem que a experiência de manipulação gera, nos machos, uma maior capacidade de encarar ativamente estressores crônicos, enquanto em fêmeas, essa intervenção precoce parece aumentar sua susceptibilidade a expressar comportamentos "depressivos", uma vez que estas se apresentam incapazes de enfrentar estes estressores, adotando um comportamento passivo alterado.

De uma forma geral, os dados parecem apontar para uma redução do comportamento emocional e a uma menor reatividade hormonal frente ao estresse na vida adulta, levando à conclusão de que a manipulação na infância aumentaria a habilidade de enfrentar estressores, incrementando a adaptação do animal ao ambiente. No entanto, algumas pesquisas no nosso laboratório (PADOIN et al., 2001; GOMES et al., 1999) mostraram que a manipulação neonatal está relacionada a uma diminuição do comportamento sexual de ratos machos e fêmeas e, além disso, aquela intervenção logo após o nascimento está relacionada a uma significativa diminuição da ovulação em ratas adultas, sendo que a maioria das fêmeas estudadas possuem ciclos anovulatórios (GOMES et al., 1999). Esses resultados dos efeitos da manipulação neonatal sobre a capacidade reprodutiva colocam em dúvida a interpretação de que os efeitos desta intervenção precoce sejam totalmente positivos, como muitos autores propõem (COSTELA et al., 1995), mesmo porque, uma redução dos comportamentos auto-defensivos também põe em risco a integridade do indivíduo (PADOIN et al., 2001).

1.1.1.2 Separação Materna

Além da manipulação neonatal, a separação materna também tem sido largamente utilizada como modelo para investigar os efeitos de experiências adversas precoces na neurofisiologia e comportamento do adulto (KALINICHEV, 2002). A interação mãe-filhote normal é um fator crítico para o crescimento e desenvolvimento em muitas espécies de mamíferos (IWASAKI et al., 2000).

O modelo de separação materna é baseado nas observações de CALHOUN (1963, apud KALINICHEV, 2002) onde, em um ambiente seminaturalístico, ratas foram obrigadas a construir seus ninhos a uma certa distância do suprimento de água e comida. Esta contingência ambiental levou a

períodos de separação mãe-ninho de 15 - 30 minutos a 2 – 3 horas de duração. Quando testados em adultos, as proles de ratos separados da mãe exibiram um conjunto de sinais comportamentais e neuroendócrinos similares àqueles observados em pacientes com desordens de depressão e ansiedade, levando vários cientistas a se interessarem por este modelo de intervenção.

Sob condições normais, durante as primeiras duas semanas após o nascimento da prole, a mãe deixa o ninho regularmente. Separações voluntárias do ninho podem durar de 10 minutos a 1 hora, dependendo da idade dos filhotes (GROTA e ADER, 1969 apud KALINICHEV et al., 2002). O procedimento da separação materna, como modelo de intervenção precoce, consiste na remoção dos filhotes do ninho por períodos maiores que o tempo normal de separação entre mãe e filhote na natureza, sendo geralmente utilizados os tempos de 3, 4.5, 6 e 24 horas, podendo variar de uma privação única, geralmente de 24 horas (SUCHECKI et al., 1993; 1997; 2000; LEHMANN et al., 1999; VAN OERS et al., 1998), a privação periódica, variando quanto à frequência e o momento do período pós-natal em que é realizada. Por ser um período de tempo suficiente para gerar uma alteração de temperatura importante dos filhotes, que ainda não possuem um controle da temperatura corporal (KUHN e SCHANBERG, 1998), este tipo de intervenção freqüentemente inclui a monitoração da temperatura do ninho através de incubadora, mantendo-a semelhante àquela do ninho com a mãe (cerca de 33°C). Na maioria dos modelos de separação materna os filhotes não são separados entre si, diferenciando-se desta forma de outros modelos como o de isolamento social. Cabe aqui salientar que muitas vezes trabalhos que utilizam o paradigma separação materna diferenciam os termos separação e privação, utilizando o último para períodos maiores que 30 minutos. Nesta pesquisa os termos separação e privação não serão diferenciados, sendo ambos considerados períodos crônicos ou repetitivos, maiores de 30 minutos. Foi escolhido para este trabalho o modelo de separação materna de 3 horas, já que este é um modelo bastante utilizado que vem mostrando ser capaz de gerar no animal adulto uma série de alterações, tanto endócrinas, quanto comportamentais (PLOTSKY e MEANEY, 1993a; 1993b; WIGGER e NEUMANN, 1999; LIU et al., 2000 KALINICHEV et al., 2002).

O aumento de interesse em estudar os efeitos deste paradigma de intervenção precoce, também tem resultado em algumas discrepâncias entre os achados, especialmente no que concerne aos sinais comportamentais interpretados como ansiedade (LEVINE, 1962; DENENBERG, 1964; MEERLO et al., 1999; LEHMANN e FEELDON, 2000). É bem sabido que os efeitos da separação materna diferem dependendo de variáveis como a duração de cada episódio de separação, o número de episódios experimentados e o período do desenvolvimento em que é realizado (IWASAKI et al., 2000). Desta forma, algumas das diferenças entre os resultados encontrados podem ser, em parte, devido à diversidade de procedimentos de separação utilizados, como o uso de diferentes linhagens, variações na duração e na frequência dos episódios de separação, se os filhotes são separados individualmente ou em grupo, bem como quanto às idades da aplicação dos testes comportamentais. Todos estes fatores parecem influenciar diferentemente os efeitos deste modelo de intervenção.

1.1.1.2.1 Efeitos Neuroendócrinos da Separação

Conseqüências do rompimento da interação mãe-filhote variam de uma marcada supressão de sistemas neuroendócrinos e fisiológicos depois de períodos breves de privação materna até o retardo do crescimento e desenvolvimento comportamental após períodos crônicos de privação (KUHN e SCHANBERG, 1998). Em diversos estudos com separação materna, o rompimento da interação mãe-filhote contribuiu para marcadas respostas comportamentais e fisiológicas de estresse na prole de muitos mamíferos. Estas respostas variaram desde breves alterações na temperatura corporal, batimento cardíaco e atividade motora durante curtos períodos de separação, até importante retardo no crescimento e atraso no desenvolvimento seguidos de tempos maiores de separação (SCHANBERG e FIELD, 1987).

Dentre os efeitos neuroendócrinos da separação materna precoce, os resultados mais comumente encontrados estão relacionados com aumento da liberação de CRH e noradrenalina (NE) no rato adulto (FRANCIS et al., 1999; LADD et al., 1996; LIU et al., 2000). Ratos privados da mãe possuem maior expressão de RNAm de CRH no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo e na amígdala central, bem como maior concentração deste hormônio na eminência mediana e no núcleo parabrâncial. Estes animais também apresentam maior ligação de CRH no locus ceruleus e concentração aumentada de noradrenalina no PVN (PLOTSKY e MEANEY, 1993a; MENZAGHI et al., 1993). Filhotes de ratos separados por 6 horas durante as primeiras três semanas de vida possuem aumento das concentrações de ACTH basal e induzido pelo estresse e menor ligação de CRH na hipófise anterior (LADD et al., 1996). Em relação ao aumento da reatividade a estímulos estressantes, a separação materna induz a uma diminuição do número de receptores de glicocorticóides no hipocampo, ao contrário do observado no modelo de manipulação (ROTS et al., 1996; SUTANTO et al., 1996; VAN OERS et al., 1998). Plotsky e Meaney (1993a) não relataram alterações na secreção de corticosterona durante e após estresse por retenção em ratos separados por 3 horas no período hiporresponsivo. Entretanto, Suchecki e colaboradores (1993) relataram que um dos efeitos imediatos da separação materna única de 24 horas, realizada no período hiporresponsivo, inclui o aumento da concentração basal de corticosterona e de corticosterona e ACTH em resposta ao estresse, sugerindo que o eixo HPA do filhote sofre uma inibição tônica da mãe. As conseqüências em longo prazo da ausência desta inibição dependem de uma série de fatores, como já referido anteriormente, a idade do filhote e a duração da separação parecem ser de uma importância crítica.

Suchecki e colaboradores (1993) examinaram se o aumento dos níveis basais e induzidos por estresse da corticosterona em ratos que foram submetidos a uma única separação materna de 24 horas seria, pelo menos em parte, devido ao aumento da secreção de ACTH. Para isso, mediram as concentrações de ACTH em resposta a um estresse moderado de injeção de salina e exposição a um ambiente novo de ratos com 6, 9 e 12 dias de idade submetidos a separação materna de 24 horas. Foram observados os

seguintes resultados: animais privados da mãe apresentaram uma maior secreção de ACTH em resposta ao estresse; a magnitude dos níveis de ACTH destes animais perante um estressor médio aumenta com a idade, se mantendo aumentado por 30 minutos. Experimentos subseqüentes neste trabalho detectaram que nem a exposição a um ambiente novo e/ou perda de calor corporal afetaram a resposta do ACTH à injeção de salina, concluindo que a separação materna é parcialmente responsável pela resposta alterada da liberação de ACTH em estresse, e que a persistência desta resposta sugere que o sistema de retro-alimentação (*feedback*) do rato nestas idades se encontra imaturo (SUCHECKI et al., 1993).

Considerando que a regulação do eixo HPA do filhote é, em parte, regulado por alguns aspectos do comportamento maternal, Suchecki e colaboradores (1993) mediram as concentrações de ACTH e corticosterona, com e sem estímulo estressor, de ratos privados da mãe que foram submetidos à privação de amamentação e/ou estimulação anogenital. Foi observado que, embora todos os animais que foram estimulados tenham apresentado níveis de ACTH baixos, somente os animais privados de amamentação apresentaram um aumento importante nas concentrações basais e induzidas por estresse de corticosterona. O procedimento de estimulação da região anogenital para induzir excreção, durante o período de privação materna, parece afetar a secreção de ACTH, suprimindo as elevações de liberação deste hormônio induzidas pela privação materna, embora as concentrações de corticosterona sejam elevadas em todos animais que sofreram privação materna, estimulados ou não. Estes resultados indicam que o papel do comportamento maternal sobre a regulação do eixo HPA do filhote ocorre em vários níveis. A amamentação parece regular a sensibilidade da glândula adrenal, enquanto a estimulação anogenital inibe a ativação dos componentes de controle central do eixo HPA.

Aparentemente, ratos jovens apresentam efeitos da privação materna opostos aos encontrados em ratos adultos, bem como diferenças de gênero importantes. Suchecki e colaboradores (2000) investigaram a resposta do eixo HPA a uma exposição de 5 minutos no campo aberto em ratos de 30

dias de idade que foram submetidos a privação materna. A resposta imediata de ACTH das fêmeas foi a mais elevada, e esta diferença foi observada até 20 minutos após a exposição ao campo. Tanto os machos quanto as fêmeas privadas da mãe apresentaram maior secreção de corticosterona imediatamente após a sessão de campo aberto. A resposta das fêmeas não privadas foi maior que a dos machos não privados, enquanto a resposta de corticosterona das fêmeas privadas foi mais baixa que as não privadas, sugerindo diferenças de gênero importantes e que ratos privados da mãe possuem uma menor resposta emocional frente a um estímulo estressor.

Francis e colaboradores (1999) demonstraram que animais separados precocemente da mãe apresentam um aumento na expressão RNAm das subunidades α_2 e α_3 de receptor GABA_A, e uma diminuição da expressão de RNAm da subunidade α_1 destes receptores. Essa evidência pode estar associada com a diminuição das ligações gabaérgicas. Tais achados sugerem que a composição do receptor GABA_A é influenciada por eventos estressantes precoces. Considerando o papel do sistema gabaérgico na inibição de CRH dos sistemas ascendentes noradrenérgicos, parece provável que estes efeitos contribuam para o aumento da reação de medo observada em animais separados da mãe precocemente.

Finalmente, uma característica primária de ratos separados da mãe precocemente parece ser uma desregulação duradoura da reatividade ao estresse regulada pelo eixo HPA.

1.1.1.2.2 Efeitos Comportamentais da Separação

Alterações comportamentais seguidas de diferentes intervenções do ambiente neonatal têm sido frequentemente atribuídas a mudanças na reatividade emocional dos indivíduos (PLOSTKY e MEANEY, 1993a; 1993b; LEHMANN et al., 1998, LEVINE, 1962; DENENBERG, 1964;

MEERLO et al., 1999). Uma série de divergências quanto aos efeitos comportamentais relacionados à resposta ao estresse de animais submetidos a diferentes procedimentos de separação materna é encontrada na literatura. Por exemplo, Rhees e colaboradores (2001) observaram que machos Sprague-Dawley separados diariamente por 6 horas do segundo ao décimo dia de vida não diferiam dos controles na atividade no campo aberto quando adultos, enquanto Ogawa e colaboradores (1994) observaram que machos Sprague-Dawley separados por 4.5 horas diariamente durante as primeiras três semanas de vida eram menos ativos no campo aberto comparados aos controles. Von-Hoersten (1993) observou que ratos separados no período neonatal apresentaram quando adultos hiperatividade e aumento do comportamento de *grooming* (autolimpeza) no campo aberto, concordando com os resultados de Suchecki e colaboradores (2000) que observaram que ratos de 30 dias submetidos à privação materna também caminham mais nos quadrantes centrais do campo, porém neste trabalho foi reportada uma menor frequência de comportamento de autolimpeza.

Wigger e colaboradores (1998) relataram que a privação materna periódica (180 minutos diários, do terceiro ao décimo dia de vida) causou mudanças crônicas no comportamento emocional e atividade do eixo HPA tanto em machos quanto em fêmeas. A princípio, estes autores observaram que os animais de ambos os sexos mostraram aumento no comportamento relacionado à ansiedade comparados aos controles. Já Matthews e colaboradores (1996) relataram que ratos submetidos ao mesmo procedimento de separação materna apresentaram uma diminuição na atividade locomotora de exploração imediata. Existe uma certa concordância de que machos de uma série de linhagens que sofreram separação apresentam sinais de aumento de comportamentos relacionados à ansiedade, comparados a ratos que sofreram manipulação em uma série de paradigmas: campo aberto, labirinto em cruz, condicionamento de sobressalto, teste de alimentação suprimida por novidade induzida (MCINTOSH et al., 1999; WIGGER e NEWMANN, 1999; CALDJI et al., 2000b; HUOT et al., 2001). Embora se saiba que os efeitos da separação dependam de variáveis como duração de cada episódio de separação, quantidade de episódios

experimentados e período do desenvolvimento em que a separação é realizada, permanece a falta de concordância quanto à presença de sinais de ansiedade aumentada em ratos separados comparados a ratos que não foram submetidos a nenhuma intervenção do experimentador.

Embora a maioria dos pesquisadores investigue as alterações causadas pela separação materna apenas em machos, aqueles que as estudaram tanto machos quanto fêmeas observaram efeitos gênero-dependentes. Lehmann e colaboradores (1999) realizaram uma série de experimentos comportamentais testando ratos Wistar de ambos os sexos separados por 24 horas da mãe em diferentes idades: 4, 9 e 18 dias de vida (MS4, MS9 e MS18). Foram avaliados dois paradigmas de medo incondicionado ou inato (campo aberto e labirinto em cruz) e paradigmas envolvendo aprendizagem em situações aversivas (*freezing* condicionado, esquiva ativa e labirinto aquático). Diferenças sexuais foram observadas na maioria dos experimentos, onde fêmeas apresentaram maior atividade no campo aberto e labirinto em cruz e aprendizagem mais rápida na esquiva ativa. Ratos machos desenvolveram mais rápido o *freezing* condicionado e obtiveram uma performance superior no labirinto aquático. Nos testes de aprendizagem em situação aversiva, ratos MS4 tiveram somente uma tendência de alteração na sua performance, enquanto ratos MS9 tiveram sua performance aumentada em relação aos controles, não havendo diferença entre separados e controles quanto ao medo em situações novas, medido nos testes de campo aberto e labirinto em cruz. As alterações dos ratos MS18 foram as menos efetivas. Nestes experimentos, os ratos machos, de forma geral, se mostraram mais afetados pela separação materna que as fêmeas.

De uma forma geral, pode-se colocar que, enquanto a intervenção por manipulação neonatal parece apontar para uma diminuição das respostas de medo/ansiedade a estímulos estressantes, períodos longos e repetidos de separação materna parecem estar relacionados a um aumento da reatividade emocional nos ratos adultos (HALL, 1998; LEHMANN et al., 1999; KAUFMAN et al., 2000) embora, no caso da separação materna, haja ainda a necessidade de se fortificar o arcabouço de dados comportamentais, visto a

divergência dos resultados encontrados.

1.2 Sistema Dopaminérgico

A dopamina (3,4 dihidroxifeniletilamina), que pertence ao grupo das catecolaminas, é um importante transmissor do sistema nervoso central dos mamíferos, onde atua no controle das funções motoras, no afeto e na integração neuroendócrina (MOOS e RICHARD, 1982; BUIJS et al., 1984; COOPER et al., 1998). Todos os neurônios dopaminérgicos contêm a enzima *tirosina hidroxilase* (TH), um catalisador do primeiro passo da síntese das catecolaminas, que realiza a conversão de tirosina em um composto denominado *L-dopa* (di-hidroxifenilalanina). A *L-dopa* é convertida no neurotransmissor dopamina pela enzima *descarboxilase*, a qual é abundante em neurônios catecolaminérgicos (BEAR et al., 2002). Bacopoulos e Bhatnagar (1977) investigaram a correlação entre tirosina hidroxilase (TH) e a atividade e concentração ou renovação de catecolaminas em várias regiões do sistema nervoso. Estes autores mostraram evidências de que a quantidade de TH pode ser considerada um índice da renovação de catecolaminas no encéfalo, e que, em regiões que contém predominantemente terminais nervosos dopaminérgicos, a atividade da TH é um índice confiável de renovação deste neurotransmissor.

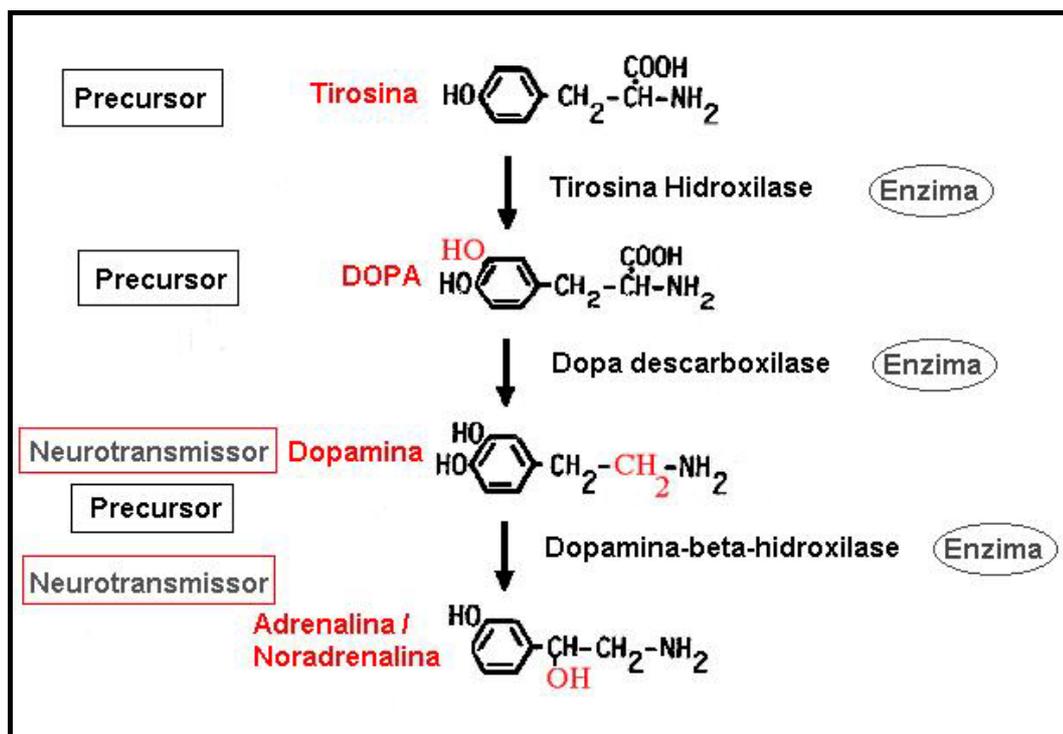


Figura. 1: Esquema da síntese das catecolaminas

Através do uso de técnicas imunofluorescência foi possível determinar a distribuição anatômica da dopamina e observar sua localização específica em sistemas de neurônios no encéfalo (CARLSSON, FALCK e HILLARP, 1962; DAHLSTRÖM e FUXE, 1964; FUXE, 1965). Mais da metade dos neurônios catecolaminérgicos presentes no sistema nervoso central são dopaminérgicos, e sua distribuição é nitidamente diferente daquela dos neurônios noradrenérgicos (LOIZOU, 1972; COYLE E HENRY, 1973; COOPER 1991; BLOOM, 1996). Desse modo surgiu a proposta de que a dopamina teria um papel biológico independente de sua função como precursora da síntese de noradrenalina (BLASCHKO, 1957; BERTLER e ROSENGREN, 1959, 1959b; HORNYKIEWICZ, 1966; COOPER et al., 1991).

Os neurônios dopaminérgicos estão distribuídos em vários sistemas locais com projeções topograficamente organizadas e altamente específicas. Eles parecem variar anatomicamente de um sistema de neurônios sem axônios (retina, bulbo olfatório) e com projeções muito restritas, a sistemas complexos com extensas arborizações axonais (MOORE e BLOOM, 1978).

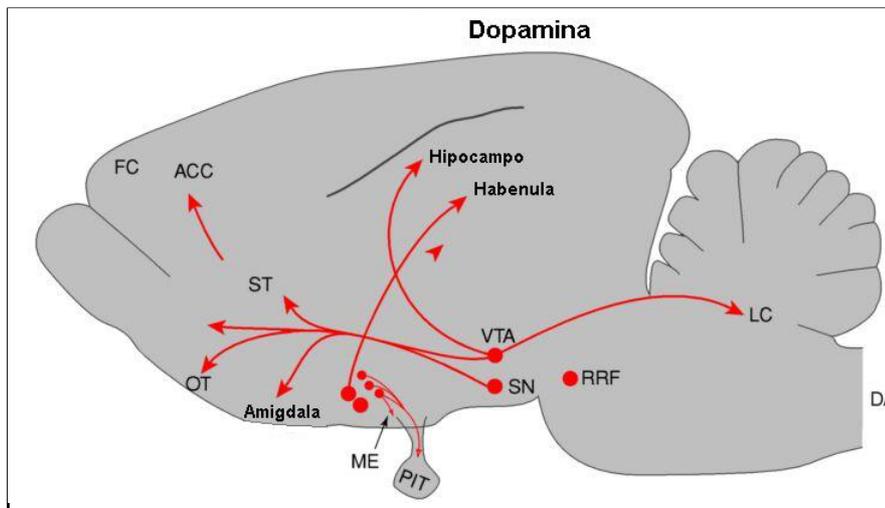


Figura 2: Vias dopaminérgicas no sistema nervoso de ratos. FC: córtex frontal; ACC: núcleo *accumbens*; ST: Estriado; OT: Trato óptico; ME: Eminência mediana; PIT: Pituitária; LC: Locus ceruleus; VTA: Área tegmental ventral; SN: Substância nigra; RRF: Campo retrorubral. (ZIGMOND et al., 1999).

1.2.1 Sistema Dopaminérgico Mesencefálico

Corpos celulares de neurônios dopaminérgicos estão presentes no mesencéfalo, onde se concentram na substância nigra, área tegmental ventral e região retrorubral. Estes neurônios dopaminérgicos formam extensas inervações prosencefálicas. Entre elas estão as projeções ao núcleo caudado e putâmen, núcleo *accumbens* e tubérculo olfatório, e uma série de regiões corticais, bem como projeções para a amígdala, área septal lateral e hipocampo ventral (ZIGMOND et al., 1999). Nos sistemas mesocortical e mesolímbico, que conjuntamente podem ser chamados de sistema mesocorticolímbico, os neurônios dopaminérgicos que se originam na área tegmental ventral projetam-se para o córtex límbico (áreas pré-frontal medial, cingulada e entorrinal) e para outras estruturas límbicas (as regiões do septo, tubérculo olfatório, núcleo *accumbens*, complexo amigdalóide e córtex piriforme), respectivamente (MOORE e BLOOM, 1978; COOPER et al., 1991;

REICHLIN, 1998). Esses sistemas influenciam o comportamento e o afeto, sendo atualmente cogitada a hipótese de que esta projeção dopaminérgica do mesencéfalo, ou sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, esteja envolvida em um sistema de "recompensa" que de alguma forma atribui valor para, ou reforça, certos comportamentos adaptativos (COOPER et al., 1991; REICHLIN, 1998; BEAR et al., 2002). Sua descoberta veio reforçar a chamada teoria dopaminérgica da esquizofrenia, segundo a qual sintomas psíquicos observados nessa doença resultariam de uma hiperatividade na transmissão dopaminérgica no sistema límbico e no córtex pré-frontal (COOPER et al., 1991).

De acordo com a descrição de Dahlström e Fuxe (1964, apud Iversen et al., 1978), o extensivo sistema dopaminérgico mesencefálico ventral pode ser dividido em três partes, (níveis 9-12 da classificação topográfica e morfológica da distribuição de corpos celulares catecolaminérgicos elaborada pelos mesmos autores): (1) células localizadas na substância nigra (SN) - grupo A9 - onde a maioria das células está agregada na parte compacta e parte lateral, enquanto somente algumas células são encontradas na parte reticulada; (2) células localizadas no tegmento mesencefálico ventromedial - A10 - onde são localizadas na área tegmental ventral (VTA), no núcleo paranigral, no núcleo caudal linear e núcleo parabrancial pigmentoso; (3) células que se estendem caudal e dorsalmente da SN até o tegmento mesencefálico ventrolateral. Nenhuma linha divisória pode ser identificada entre estas três partes do sistema (IVERSEN et al., 1978).

Os terminais dopaminérgicos são encontrados em sua maioria no lobo frontal e na área entorrinal ventral. Acredita-se que estas inervações dopaminérgicas originem-se nos grupos de células da área A10. Está bem estabelecido que as vias aferentes dopaminérgicas neocorticais originam-se no mesencéfalo, sendo os sistemas anteromedial e suprapiramidal originados em diferentes partes dos grupos de células das áreas A9 e A10.

No sistema nigro-estriatal, os neurônios dopaminérgicos da substância nigra projetam-se ao neostriado (caudado-putâmen) (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964; FUXE, 1965; MOORE e BLOOM, 1978;

COOPER et al., 1991). Esses neurônios têm um importante papel no controle das funções motoras somáticas (BERTLER e ROSENGREN, 1959a, 1959b; REICHLIN, 1998). As degenerações dos neurônios dopaminérgicos da substância nigra causam uma diminuição de dopamina nas fibras nigro-estriatais, cessando a atividade moduladora que essas fibras exercem sobre o circuito motor básico ao nível do neostriado, provocando as perturbações motoras que caracterizam a Síndrome de Parkinson (COOPER et al., 1991).

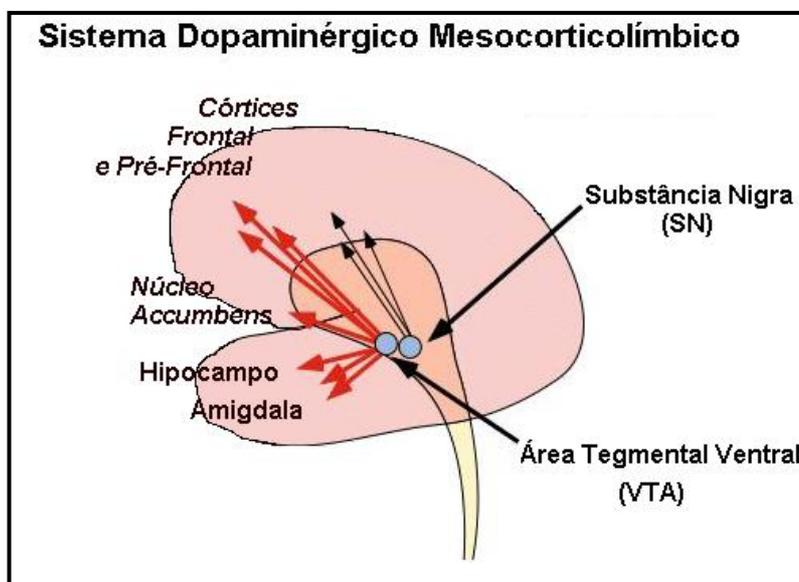


Figura 3: Ilustração do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico

1.2.1.1 Complexo SN-VTA

A área tegmental ventral (VTA) ou também chamado núcleo tegmental ventral de *Tsai* (TSAI, 1925), consiste em alguns grupos heterogêneos de células agrupadas próximas à linha média do assoalho do mesencéfalo. A VTA se encontra bilateralmente na linha média com uma aparência quase semicircular em secções transversas. Na sua extensão caudal ela se encontra dorsalmente ao núcleo interpeduncular. Lateralmente a VTA

está a substância nigra (SN) (OADES e HALLIDAY, 1987). Paxinos em sua obra *The Rat Nervous System* (1995), analisa a VTA e a SN, considerando-as um único sistema: VTA-SN. Em sua descrição, o autor coloca que estas áreas são em grande parte contínuas exceto onde o núcleo terminal medial do sistema óptico acessório se atravessa entre o nível médio-rostral das duas áreas. A dimensão rostro-caudal do sistema VTA-SN é de 2,5 mm de comprimento, e sua dimensão medial-lateral é de 3mm de largura. A SN compacta possui um volume de 0,3 mm³ e contém 10.000 – 12.000 neurônios de cada lado, enquanto a VTA possui um volume de 1,2 mm³ e contém 27.000 neurônios de cada lado. A região da substância nigra no complexo VTA-SN é uma coleção de elementos química e funcionalmente heterogêneos inter-relacionados. A substância nigra compacta (SNCo) é composta por uma camada de neurônios dopaminérgicos sobrepondo à substância nigra reticulada (SNR). A SNR é uma estrutura composta por neurônios gabaérgicos que formam a maior estação de aferências dos gânglios basais. A extensão lateral da SNCo é a substância nigra lateral (SNL), que possui muitas similaridades com a SNCo e SNR. Embora não seja óbvio em ratos, a SNCo é pigmentada em primatas, especialmente em humanos adultos, e sua coloração escura deve-se a pigmentos de melanina presentes nos neurônios dopaminérgicos, daí sua denominação. Os neurônios dopaminérgicos da SNCo, também chamados de grupo celular dopaminérgico A9, como descrito anteriormente, se estende posteriormente até o campo retro-rubral, tornando-se o grupo celular dopaminérgico A8. Medial e dorso-medial a SNCo e SNR está a VTA. A VTA inicia-se anteriormente como área tegmental rostral (VTAR). Nos níveis médio-anteriores, a VTA é composta dorsalmente pelo núcleo parabrancial pigmentado (PBP), com volume de 0,6 mm³ e 11.000 neurônios (40% do total da VTA) e ventralmente, na sua porção mais caudal, encontra-se o núcleo paranigral (PN), que é menos distinto no rato (0,3 mm³ e 7000 neurônios), que em outras espécies. Na sua linha média, a VTA contém o núcleo rostral linear (RLI), que é ainda menor (0,1 mm³ e 8840 neurônios), e o igualmente pequeno (0,1 mm³ e 6.000 neurônios) núcleo interfascicular. Caudalmente encontra-se o núcleo linear caudal (CLi) preenchendo a linha média da VTA (0,2 mm³ e 2.000 neurônios).

A VTA contém uma mistura mais semelhante de neurônios não-dopaminérgicos (20%) e dopaminérgicos (80%) (SWANSON, 1982). Em comparação nas várias espécies, a VTA do rato é mais similar à dos humanos na sua distribuição celular do que a VTA de outros primatas não-humanos, dignificando assim o encéfalo do rato como um modelo útil para o estudo do encéfalo humano (PAXINOS, 1995).

1.2.1.1. 1 Citoarquitetura do Complexo SN-VTA

A SNCo contém neurônios dopaminérgicos de tamanho médio (11 x 20 μm) densamente empacotados, com o núcleo colocado centralmente contendo invaginações nucleares basofílicas. O padrão dendrítico de muitos neurônios da SNCo, especialmente em sua porção ventral, têm a aparência de neurônios piramidais do córtex invertidos. Nestes neurônios, um ou dois dendritos apicais longos dirigem-se ventrolateralmente para a SNR. Frequentemente, os neurônios dopaminérgicos adjacentes formam ilhas de dendritos que invadem a SNR, estes dendritos podem liberar dopamina (CHERAMY, 1975 apud PAXINOS, 1997) que podem interagir com auto-receptores dopaminérgicos, receptores dopaminérgicos de dendritos de neurônios dopaminérgicos adjacentes, neurônios estriato-nigrais, ou uma combinação destes. Outros dendritos de neurônios dopaminérgicos da SNCo se espalham médio-lateralmente no plano inclinado da SNCo. Mais raramente estes dendritos invadem as camadas dorsais da SNCo e neurônios da VTA.

Um segundo tipo de neurônio dopaminérgico da SNCo está localizado em um plano mais dorsal. É um neurônio típico, de tamanho médio, fusiforme, com dendritos que se espalham no plano médio-lateral. Os neurônios da camada mais dorsal da SNCo são contínuos com os neurônios mais mediais do PBP da VTA, por esta razão, estes neurônios da camada dorsal da SNCo são funcionalmente e anatomicamente mais relacionados aos

neurônios da VTA. Um terceiro tipo de neurônio encontrado na SNCo, e em outras áreas do complexo SN-VTA é um neurônio estrelado, pequeno (10-12 μm), com três a cinco finas arborizações dendríticas. Estes neurônios, que coletivamente formam 10% dos neurônios da SNCo possuem um núcleo relativamente grande e um claro citoplasma, sendo provavelmente um interneurônio não-dopaminérgico (PAXINOS, 1997).

A localização precisa e a arquitetura dendrítica dos neurônios da SNCo fornecem uma base morfológica para sua habilidade de integrar atividade tanto motora quanto límbica. Seus dendritos da camada dorsal estão estrategicamente localizados para receber aferências diretas dos córtices cingulado e frontal, e aferências indiretas dos córtices límbicos, através de projeções por vias estriatais. Os dendritos da SNCo que penetram na SNR recebem aferências topograficamente organizadas do compartimento matriz do estriado, que está sobre a influência clássica (não-límbica) extrapiramidal dos córtices sensório-motores. Desta forma, neurônios da SNCo estão perfeitamente situados para integrar os sistemas prosencefálicos límbicos e não-límbicos, influenciando uma vasta gama de comportamentos (PAXINOS, 1995).

Neurônios da VTA possuem uma grande variedade de formas e tamanhos. Um tipo no PBP é muito similar ao tipo fusiforme da camada mais dorsal da SNCo. Outros neurônios da PBP são globulares em forma, de tamanho médio com uma série de arborizações dendríticas. Os neurônios do PN são de tamanho médio e fusiformes. Alguns neurônios do PN são pequenos com dois ou quatro espinhos dendríticos primários. Os neurônios do núcleo Interfascicular (IF) são densos, pequenos (10-13 μm de diâmetro) e arredondados. O núcleo RLi contém os maiores neurônios da VTA, com tamanho médio de 15 μm em diâmetro, enquanto o núcleo CLi contém neurônios menores, com 14 μm de diâmetro.

1.2.2 Sistema Dopaminérgico e Estresse

Tem sido cada vez mais enfatizado o importante papel exercido pelas projeções dos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral e substância nigra no prosencéfalo límbico e córtex pré-frontal na cognição e efeitos comportamentais em situação de estresse (WATANABE, 1984; NAKAMURA et al., 1992). Vários trabalhos (ENRICO et al., 1998; WATANABE, 1984; AXEROLD e RESINE, 1984) têm demonstrado que a ativação comportamental ou condições de estresse por ambientes novos, pressão na cauda ou imobilização, aumentam a atividade de dopamina nas regiões mesolímbicas e mesocorticais do encéfalo. Estes efeitos são mais pronunciados nos neurônios dopaminérgicos mesocorticais (ENRICO et al., 1997).

Uma variedade de estressores causa mudanças na atividade de enzimas que sintetizam catecolaminas e das concentrações de noradrenalina e adrenalina no encéfalo. O estresse prolongado promove mudanças na atividade de enzimas como a tirosina hidroxilase, a dopamina β -hidroxilase e a feniletanolamina N-metiltransferase (PNMT). Essas mudanças da atividade das enzimas são reguladas por vários glicocorticóides, ACTH e atividade neural. Quando ratos são submetidos a estressores psico-sociais como competição por comida e espaço, eles apresentam aumento da pressão sangüínea, do peso da adrenal e da concentração de catecolaminas na medula adrenal. Neste caso, as enzimas tirosina hidroxilase e PNMT estão aumentadas no rato (AXELROD e RESINE, 1984).

Sabe-se, portanto, que estímulos estressores variados provocam alterações das concentrações de dopamina no encéfalo. O estresse de imobilização ativa a síntese de dopamina nos neurônios dopaminérgicos mesolímbicos (WATANABE, 1984). Nakamura e colaboradores (1992) sugerem que os neurônios dopaminérgicos no sistema nervoso central, particularmente o sistema dopaminérgico mesocortical, estão envolvidos não somente em mudanças emocionais, mas também na regulação de respostas induzidas por estresse como exposição aguda ao som e à vibração corporal. Sudha e

Pradhan (1995) demonstraram que ratos imobilizados a 4°C por 2 horas ativaram o metabolismo de dopamina no córtex pré-frontal, núcleo *accumbens* e estriado.

Ao estudar a ativação de dois componentes do sistema simpato-adrenal (medula adrenal e nervos simpáticos) por diferentes estressores, Kvetnansky e colaboradores (1998) demonstraram que o estresse por imobilização e exposição ao frio aumentam os níveis de dopamina plasmática. Nesse mesmo estudo, ratos que sofreram apenas imobilização ativaram o metabolismo da dopamina somente no córtex pré-frontal. A pré-exposição crônica ao estresse psicológico de isolamento pode resultar em alterações significativas nos níveis de RNAm de tirosina hidroxilase no *locus ceruleus* e em núcleos dopaminérgicos do mesencéfalo, e estas respostas diferem em curso e frequência. O estresse por frio não muda as concentrações de RNAm da tirosina hidroxilase nem a atividade enzimática da tirosina na SN, enquanto o estresse por isolamento breve eleva o RNAm da tirosina hidroxilase tanto na VTA quanto na SN, com o pico observado após 14 dias de isolamento, portanto, o estresse por isolamento social repetitivo altera tanto os níveis de RNAm quanto à atividade da tirosina hidroxilase nestas áreas (ANGULO et al., 1991).

Ao investigar as aferências neuronais na área tegmental ventral que modulam o aumento de dopamina induzida por estresse, Enrico e colaboradores (1998) verificaram que neurônios colinérgicos, agindo via receptores muscarínicos e nicotínicos, inervam os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral, mas estes não parecem ser afetados por exposição ao estresse por manipulação do experimentador. Já aferências glutamatérgicas em neurônios da VTA, agindo tanto via receptores glutamatérgicos NMDA quanto não-NMDA, possivelmente agem em cooperação, tendo um proeminente papel no aumento da liberação de dopamina induzida pelo estresse por manipulação, no córtex pré-frontal medial. Estudos anatômicos têm mostrado que as inervações glutamatérgicas da VTA podem surgir de três diferentes fontes: do córtex pré-frontal medial, dos núcleos sub-talâmicos e dos núcleos pedúnculo-pontinos. Os resultados de Enrico e colaboradores (1998)

também sugeriram um possível papel dos neurônios gabaérgicos, agindo via receptores GABA_B, como mediadores da liberação de dopamina na VTA em consequência ao estresse.

Estudos comparativos entre diferentes linhagens de camundongos (C57BL/6J e DBA/2Jico) mostraram diferentes respostas de liberação de dopamina na região mesocortical e meso-*accumbens* pela exposição a estímulos estressores. Observou-se uma ativação forte e rápida do metabolismo da dopamina mesocortical em camundongos da linhagem C57BL/6J (genótipo usado comumente como modelo experimental de depressão) e o oposto em camundongos da linhagem DBA/2Jico, o que leva a hipótese da existência de um controle genético no balanço entre a dopamina mesocortical e meso-*accumbens* quanto sua resposta ao estresse (VENTURA et al., 2001).

Moore e colaboradores (2001) examinaram os efeitos de um estressor crônico (exposição prolongada ao frio) sobre a atividade elétrica espontânea dos neurônios dopaminérgicos na SN e VTA. Foi observado que os ratos expostos ao frio demonstraram 64% menos atividade espontânea de neurônios dopaminérgicos comparados aos controles, embora o pico médio de atividade das células dopaminérgicas que permaneceram ativas dos ratos expostos ao frio não se diferenciasses significativamente dos controles. Uma proporção significativa destas células apresentou uma atividade de disparo excessiva. Moore e colaboradores (2001) mostraram que o estresse crônico pode levar a cessação da atividade espontânea em uma sub-população de células dopaminérgicas da VTA e SN. Tais mudanças podem indicar que diferentemente do estresse agudo, que pode potencialmente ativar os sistemas dopaminérgicos mesolímbico/mesocortical, o estresse crônico leva a uma redução adaptativa do número de células dopaminérgicas ativas, talvez alterando a resposta destes sistemas a subseqüentes estressores.

1.2.2.1 Sistema Dopaminérgico e Estresse Neonatal

Alguns trabalhos na literatura têm relacionado o sistema dopaminérgico com a estimulação no período neonatal. Adams e Moghaddam (2000) observaram que a manipulação neonatal aumentou significativamente os níveis de dopamina na região septal. Inglis e Moghaddam (1999) demonstraram que a manipulação por 20 minutos aumentou os níveis extracelulares de dopamina na BLA, no córtex pré-frontal e no núcleo *accumbens* e eles sugerem que a inervação dopaminérgica da amígdala pode ser mais responsiva ao estresse do que outras regiões inervadas por dopamina no sistema límbico, incluindo o córtex pré-frontal. Estes autores correlacionaram a dopamina da amígdala aos processos normais e patofisiológicos da resposta de um organismo ao estresse.

O isolamento no período neonatal também tem efeito sobre o sistema dopaminérgico. Ratos adultos que foram isolados diariamente, do dia 2 ao dia 9 pós-natal, apresentaram, quando colocados em um ambiente novo, um aumento no índice de renovação (*turnover*) da dopamina nas regiões hipotalâmicas e septal, que são parte do sistema límbico e recebem inervação da via dopaminérgica mesolímbica. Já o estriado, que recebe inervação da via dopaminérgica nigro-estriatal não apresentou diferença entre os ratos controles e isolados, demonstrando que o sistema dopaminérgico nas várias estruturas cerebrais pode não responder da mesma forma a um mesmo estímulo (KEHOE et al., 1998).

Assim como na estimulação no período neonatal, observou-se que o estresse aplicado no período pré-natal também tem efeitos sobre o sistema dopaminérgico na vida adulta. Wang e colaboradores (1995) observaram que o estresse pré-natal pode resultar em um déficit na neurotransmissão dopaminérgica no núcleo *accumbens* e esse déficit pode possivelmente causar diminuição no comportamento sexual em ratos.

A proposta de verificar a participação do sistema dopaminérgico nas alterações comportamentais decorrentes do estresse neonatal se baseia no fato deste neurotransmissor ter papel na resposta à

exposição ao estresse na vida adulta. Através dessa correlação neurocomportamental pretende-se avaliar possíveis alterações no sistema dopaminérgico decorrentes da experiência de estresse precoce que expliquem as alterações comportamentais apresentadas por estes animais.

1.3 Medo

A exposição a condições hostis resulta em uma série de respostas coordenadas organizadas para aumentar a probabilidade de sobrevivência. Estas respostas coordenadas, freqüentemente referidas como "respostas de estresse", são compostas por alterações no comportamento, funções vegetativas e na secreção de diversos hormônios (VAN DE KAR e BLAIR, 1999), enquanto o medo, é uma emoção adaptativa que sinaliza perigo, evocada por esta exposição a situações hostis. Entre outras funções, o medo serve tanto para organizar respostas somáticas e vegetativas (como imobilização e respostas simpáticas) quanto para motivar a ação (fuga e esquiva) frente à ameaça (MAREN, 2001). Neste sentido, pode se considerar que o medo é um termo usado para definir o estado subjetivo conseqüente da exposição direta ou indireta a um "estressor" que ameaça a homeostase do indivíduo. Segundo Van de Kar e Blair (1999), estes estressores podem ser definidos como condições que põe em risco a sobrevivência de um indivíduo, ou são percebidas como tal. Para este autor, os estressores podem ser agrupados em três grandes categorias: a) estressores psicológicos baseados em uma resposta aprendida frente à ameaça de uma condição adversa iminente (medo, ansiedade, exposição a um ambiente novo ou incontrolável), b) estressores que consistem de um estímulo físico, e têm um forte componente psicológico (dor, choque nas patas, imobilização), e c) estressores que desafiam a homeostase cardiovascular (hemorragia, estresse ortostático, exercício, exposição ao calor).

Há também uma classificação de estímulos estressores nas categorias: físico e psicológico. Para Fink (2000), a divisão entre estressores em físicos e psicológicos é na maioria das vezes heurística, no sentido de que a maioria dos estressores físicos têm componentes psicológicos e estressores psicológicos freqüentemente possuem um componente físico. Por outro lado, tem sido mostrado que a antecipação de estressores físicos, como, por exemplo, choque elétrico ou imobilização, envolvem fortes componentes psicológicos a estes estressores. Desta forma, o estressor utilizado no paradigma de medo aprendido nesta pesquisa será considerado um estressor psicológico, por se tratar do próprio comportamento de antecipação do estímulo choque elétrico que será avaliado.

1.3.1 Medo Inato e Medo Adquirido

Na teoria de medo proposta por Watson em 1924, um estímulo inato para o medo (isto é, aqueles capazes de causar medo sem uma aprendizagem especial de que são perigosos ou nocivos) poderia ser limitado ao barulho, perda repentina de suporte e dor. Todos os outros estímulos que podem produzir medo seriam então supostamente adquiridos. A teoria de medo de Watson hoje é considerada demasiadamente simplista, principalmente por tratar de forma igual todas as espécies, como se a definição dos estímulos eliciadores de medo fosse a mesma independente da espécie. Um grande número de estímulos bastante complexos, além daqueles listados por Watson, são inatamente capazes de produzir medo, e tais estímulos podem ser diferentes em diferentes espécies.

Gray, em sua obra *The psychology of fear and stress* (1987), classifica todos os estímulos de medo em cinco princípios gerais: intensidade, novidade, “perigos evolucionários especiais”, estímulos que surgem durante interações sociais e estímulos de medo condicionado. Embora a dor tenha

saído da lista de estímulos eliciadores de medo de Gray, este autor associa o medo e a dor na seguinte afirmação, que segundo ele representa o senso comum: "devemos nomear medo, o estado que é eliciado pelo estímulo que dá o aviso de dor, não o estado eliciado pelo estímulo doloroso em si", (GRAY, 1987: p.19), ou seja, medo ocorreria pela antecipação da dor. Mas esta não é ainda uma definição completa de medo inato. Quando o autor explica o terceiro princípio, "perigos evolucionários especiais", onde alguns dos estímulos eliciadores de medo poderiam ser enquadrados, uma definição mais ampla de medo inato pode ser explicitada: "onde uma situação particular é repetidamente responsável pela a morte de uma quantidade significativamente grande da população (em escala evolucionária) por um período de tempo suficientemente grande, os indivíduos desta espécie podem desenvolver um medo inato frente a alguns dos estímulos característicos desta situação e evita-los. A aumentada probabilidade de sobrevivência da espécie que desenvolver tal medo inato é óbvia".

Embora muitos estímulos possam ser causadores de medo inato, a aprendizagem é extremamente importante na gênese do medo. Um papel central em tal aprendizagem é comumente atribuído ao processo do condicionamento clássico (GRAY, 1987).

1.3.1.1 Condicionamento Clássico e Medo Aprendido

Uma variedade de paradigmas comportamentais tem sido desenvolvida para mimetizar o estresse psicológico humano em modelos animais. A maioria das pesquisas que investigam as bases neuroanatômicas e neuroquímicas do estresse psicológico induzido por liberação de hormônios utiliza ou o paradigma de medo condicionado ou estresse por imobilização/contenção (VAN DE KAR e BLAIR, 1999).

O condicionamento clássico foi primeiramente estudado no

início do século passado por Pavlov, fisiologista russo, que o definiu como um processo de substituição de estímulos. Um estímulo antes neutro adquire o poder de eliciar a resposta que originalmente era eliciada por outro estímulo. A mudança ocorre quando o estímulo neutro for seguido pelo estímulo efetivo. Pavlov também investigou também o processo inverso pelo qual o estímulo condicionado perde seu poder de evocar a resposta quando deixa de ser reforçado, processo que chamou de extinção. No modelo experimental de Pavlov, o sujeito é repetidamente exposto a uma seqüência na qual um estímulo inicialmente neutro (como um tom ou um *flash* de luz) é seguido logo em seguida ou mesmo sobreposto por um estímulo de alguma significância biológica para o animal (como comida ou estímulo doloroso). O último, ou estímulo incondicionado (EI) elicia sem nenhuma aprendizagem prévia um conjunto de respostas reflexas incondicionadas. Quando os pareamentos de estímulos são continuados, o estímulo que antes era neutro torna-se condicionado (EC), na medida que passa a eliciar por si próprio alguma parte do total de respostas inicialmente eliciadas apenas pelo estímulo incondicionado, que são chamadas de respostas condicionadas (RC) (GRAY, 1987; SKINNER, 1994; LE DOUX, 1998).

O condicionamento do medo é uma variação do condicionamento clássico descoberto por Pavlov na virada do século passado. Um dos primeiros experimentos onde o medo aprendido foi utilizado como modelo de avaliação de estresse psicológico foi o de Hunt e Otis, (1953, apud GRAY, 1987), onde foi apresentado a um rato um *flash* de luz por 3 minutos (estímulo neutro - EN) em que no final, um choque (EI) era disparado nas patas do animal. Os experimentadores utilizaram a defecação como índice de medida da resposta de medo, e observaram que, no final do pareamento, a defecação, que ocorria antes somente quando o choque era emitido, agora aumentava sua frequência diante à emissão do *flash* de luz (EC). Depois, numa fase seguinte do experimento, quando a luz era apresentada seguidamente sem ser seguida por choque, a tendência era de uma diminuição gradativa de defecação, produzindo uma típica curva de extinção. Existem muitos outros experimentos mostrando que outras respostas sintomáticas do medo (mudanças da frequência cardíaca, da respiração, etc.) podem ser classicamente

condicionadas de maneira similar. Uma característica peculiar do condicionamento clássico do medo surge quando levamos em conta uma resposta em particular, que é comumente usada como índice de condicionamento: a imobilização ou *freezing*, como é chamada em inglês. O condicionamento do medo não inclui o aprendizado da reação, embora os ratos imobilizem-se quando estão expostos a um som depois, mas não antes do condicionamento, este não ensina os ratos a imobilizarem-se. Os ratos paralisam-se naturalmente quando são expostos ao perigo. Ratos criados em laboratório, que nunca viram um gato, vão imobilizar-se ao encontrarem pela primeira vez seu predador natural. A imobilização é uma reação de defesa inata que pode ser ativada tanto por um estímulo eliciador aprendido quanto natural. (LE DOUX, 1998) Muitas outras espécies demonstram este padrão de imobilidade tensa e silenciosa quando em situações de perigo, porém esta resposta apresenta um padrão de aprendizagem incomum. Na definição do condicionamento clássico, Pavlov colocou a existência de uma substituição de estímulos, onde o estímulo condicionado (EC) passaria a eliciar exatamente as mesmas respostas que o estímulo incondicionado (EI) eliciaria, mas esta visão do condicionamento não é muito clara, o padrão de respostas eliciadas pelo EC provavelmente nunca é uma cópia exata da reação ao EI. Portanto, pode-se dizer que o EC não produz uma mudança no comportamento a menos que o EI produza uma mudança do mesmo tipo na mesma direção, (porém não necessariamente no mesmo grau). Todavia a resposta de imobilização é uma exceção a esta regra. O rato normalmente responde ao choque com grande aumento de reatividade, dirigido a encontrar uma saída da situação ou atacando uma característica do ambiente; já o estímulo neutro que foi pareado com o choque irá eliciar a resposta inversa: imobilidade (GRAY, 1987).

Este autor apresentou duas explicações possíveis (não mutuamente excludentes) para este dilema. Uma delas é considerar que o rato está equipado com uma resposta inata (*freezing*) ao estímulo que vem seguido de outro que gera medo incondicionado, (ou seja, ele teria uma resposta inata específica para o estímulo neutro que fosse condicionado) e somente precisaria aprender (via condicionamento) a qual estímulo neutro ele deve responder desta forma. Esta mistura de comportamento inato e aprendido

poderia funcionar em paralelo, tendo um valor adaptativo, na medida que o animal responde à dor infligida por um predador, correndo e lutando, mas ao estímulo que anuncia previamente a presença de perigo, permanecendo imóvel e talvez escapando da atenção do predador. A segunda explicação possível que Gray apresentou para o dilema da resposta de imobilização do rato perante os EC, leva ao abandono da idéia de que, no condicionamento clássico, o que é condicionado ao estímulo neutro é a resposta em si. Ao invés disso, se supõe que o EC serviria, como resultado do condicionamento, para evocar algum tipo de mudança de estado no sistema nervoso.

O condicionamento do medo proporciona que canais de reações neurofisiológicas, produzidas ao longo do desenvolvimento diante de novos estímulos, antecipem o perigo, adquirindo o controle de formas comprovadamente eficazes de reagir. O perigo antecipado por estes estímulos deflagradores aprendidos pode ser real ou imaginário, concreto ou abstrato, oferecendo uma ampla gama de condicionamentos externos (ambientais) e internos (mentais) que podem servir de EC. O aprendizado do medo condicionado é muito rápido e pode dar-se em seguida a um pareamento de EC-EI. Este aprendizado é também duradouro, sendo dificilmente esquecido. No entanto, a exposição repetida ao estímulo condicionado, na ausência do estímulo incondicionado, pode produzir a extinção, como já foi citado. Porém, a extinção não significa o fim da relação EC-EI. Pavlov observou que uma resposta poderia ser completamente extinta num dia, mas no dia seguinte, o estímulo condicionado estaria novamente pronto para produzir a sua reação condicionada: fenômeno este denominado recuperação espontânea (LE DOUX, 1998).

1.3.2 Neurobiologia do Medo

É reconhecido há décadas que a amígdala está criticamente

envolvida na regulação do medo em mamíferos. De fato, um considerável número de evidências (DAVIS, 1997; FENDT e FANSELOW, 1999; LE DOUX, 2000; MAREN, 2001; MCGAUGH, 2000) têm indicado que formas de aprendizado motivadas pelo medo, tal como o condicionamento clássico do medo e o condicionamento de esquiva instrumental, envolvem o complexo basolateral da amígdala (BLA). Embora não haja discordância quanto ao fato de que a BLA possua um papel importante na aprendizagem motivada pelo medo, diferentes achados em relação ao papel preciso deste núcleo amigdalóide têm vindo à tona nos últimos anos (MAREN, 2001). Maren (2001) realizou lesões neurotóxicas no BLA após o treino de um condicionamento contextual e verificou que severos déficits nas medidas de imobilização (latência, duração e frequência) chegando a medidas similares àquelas encontradas em ratos que não foram submetidos ao estímulo incondicionado. Seus resultados conferem com os demais achados, que indicam que diferentes respostas de medo, incluindo o condicionamento de sobressalto (CAMPEAU et al., 1995; SANANES e DAVIS, 1992), analgesia (HELMSTETTER e BELLGOWAN, 1993) e mudanças na frequência cardíaca (GENTILE et al., 1986) são interrompidas após lesões pós-treino na amígdala. Estes dados suportam a hipótese de que a BLA teria um papel no estoque de memórias relacionadas ao medo (DAVIS, 1997; FANSELOW e LE DOUX, 1999; LE DOUX, 2000; MAREN, 1999). Segundo este ponto de vista, lesões na BLA resultariam na abolição do *freezing* condicionado por apagar a memória da associação dos estímulos condicionado e incondicionado estabelecida durante o condicionamento (MAREN, 2001). Diferenças entre os mecanismos neurais subjacentes ao condicionamento clássico de medo contextual (onde o estímulo neutro é o próprio ambiente onde o condicionamento é realizado) e o condicionamento clássico de medo com pista (onde o estímulo neutro pode ser um estímulo auditivo ou visual) também têm sido observadas. Maren (200; 1998; 1999) observou que lesões na BLA parecem afetar mais intensamente o condicionamento de medo contextual, podendo não ter efeitos em outros modelos de condicionamento. De forma geral, os efeitos de lesões na BLA parecem depender do período em que foram realizadas, do tipo de condicionamento envolvido, bem como da intensidade do condicionamento, ou

seja, enquanto lesões pós-treino produzem déficits globais e completos na resposta de imobilização do medo condicionado independente da intensidade do treino ou modalidade do estímulo condicionado (auditivo ou contexto), lesões pré-treino deste núcleo parecem apresentar alterações mais limitadas, produzindo déficits globais no condicionamento com estímulo auditivo mesmo com treinos intensivos, podendo ser revertido pelo treino intensivo no condicionamento contextual.

O bem documentado papel da amígdala no condicionamento do medo e a substancial inervação dopaminérgica da amígdala sugerem uma contribuição do sistema dopaminérgico mesoamigdalóide na aquisição e expressão do medo condicionado (GUARRACI et al., 1999). Evidências acumuladas (BOROWSKI et al., 1996; COCO et al., 1992; DEUTCH et al., 1991; TRULSON et al., 1984) sugerem que os neurônios dopaminérgicos da VTA contribuem na circuitaria que modula os comportamentos motivados pelo medo através da amígdala. A conhecida capacidade da cocaína de aumentar a responsividade ao medo e a habilidade dos neurolépticos de diminuir essa responsividade, sugere a importância do papel da dopamina no comportamento emocional aversivo.

Greba e colaboradores (2000) demonstraram que o uso de um antagonista não-específico de receptor muscarínico nos neurônios da área tegmental ventral resulta na inibição da resposta de alarme no condicionamento reflexo pavloviano em ratos, não alterando as respostas sensório-motoras basais. Tais evidências levam a identificação da acetilcolina atuando na VTA como neurotransmissor responsável por um mecanismo excitatório potencial que é subjacente às propriedades das respostas de medo frente a estímulos ambientais ameaçadores. Sabe-se que a exposição de um animal à experiência de medo condicionado está associada ao aumento do metabolismo da dopamina na VTA. Munro e Kokkinidis (1996) demonstram que o uso do agonista quinpirole para receptores dopaminérgicos D₂ na VTA bloqueia a resposta de alarme no condicionamento de sobressalto sem alterar a resposta de alarme por estímulo acústico, concluindo que os neurônios dopaminérgicos na VTA regulam os aspectos excitatórios da expressão do

medo modulando a expressão emocional aversiva no sistema de medo baseado na amígdala. A atividade dos neurônios dopaminérgicos na VTA do rato é tonicamente inibida pelos receptores somatodendríticos dopaminérgicos D₂ e GABA_A. Sabe-se que eferências dopaminérgicas da VTA inervam os núcleos central e basolateral da amígdala, pois lesões na VTA levaram a depleção da dopamina amigdalóide, enquanto a estimulação química em neurônios desta área aumenta o metabolismo da dopamina na amígdala (HAGAN, et al., 1990). Lamont e Kokkinidis (1998) verificaram que a infusão do antagonista do receptor de dopamina D₁ SCH 23390 na amígdala bloqueia a expressão de medo, salientando o papel da atividade mesoamigdalóide nas reações excitatórias do medo condicionado.

O sistema dopaminérgico possui um importante papel na reatividade a perturbações do ambiente, no processamento seletivo de informações e na modulação de respostas emocionais, sendo todas estas funções essenciais na habilidade de lidar com as adversidades do mundo externo. (SUZUKI et al., 2002). Várias pesquisas têm mostrado que a reatividade da dopamina frente estímulos estressores ocorre seletivamente em diferentes locais do encéfalo, dependendo das propriedades do estresse utilizado. Por exemplo, estresse por choque na cauda está relacionado a aumento da dopamina no estriado e no núcleo *accumbens* (KEEFE et al., 1990; SUZUKI et al., 2002), enquanto a reatividade da dopamina frente a estressores psicológicos está mais relacionada com o córtex pré-frontal (TIDEY e MICZEK, 1996) e com a amígdala, eferência importante das enervação dopaminérgicas advindas da VTA e profundamente envolvida com as repostas comportamentais do medo condicionado (SUZUKI et al., 2002; YOSHIOKA et al., 1996; WU et al., 1999).

1.4 Estresse neonatal, Expressão do Medo e Sistema Dopaminérgico

Alterações do ambiente no período mais precoce de desenvolvimento do indivíduo podem causar efeitos de longo prazo em parâmetros comportamentais e neurofisiológicos relacionados ao enfrentamento de situações de estresse (MEANEY et al., 2002). De forma geral, tanto o paradigma da manipulação neonatal, originalmente desenvolvido por Levine (1957, apud PAPAIOANNOU, et al., 2002), quanto o de separação materna vêm sendo bastante cogitados como modelos úteis para o entendimento dos processos subjacentes às experiências aversivas precoces, e estão relacionados com alterações na habilidade do indivíduo de responder, enfrentar e se adaptar a estímulos estressores (PLOTSKY e MEANEY, 1993a; 1993b; MEERLO et al., 1999; PAPAIOANNOU et al., 2002; PADOIN et al., 2000; COSTELA et al., 1995). Interessantemente os modelos de manipulação e separação parecem ter efeitos neurofisiológicos exatamente opostos (MEANEY et al., 2002), como já foi mencionado anteriormente. Estudos prévios em nosso laboratório mostraram que animais manipulados no período neonatal apresentaram uma menor inibição comportamental em dois testes de medo inato: campo aberto e campo aberto com gato (FOSSATI, 2000). Embora as respostas comportamentais inatas frente a estímulos estressores tenham sido bastante investigadas, os aspectos da aprendizagem do medo em animais manipulados permanecem ainda inexplorados, bem como ocorre com o modelo de separação materna. Neste modelo, os efeitos comportamentais sobre a resposta a estímulos estressores parecem ainda inconclusivos, visto que existe na literatura uma falta de concordância geral nos resultados obtidos, embora em um nível neuroendócrino estes efeitos já estejam bem estabelecidos (SCHANBERG e FIELD, 1987; KUHN e SCHANBERG, 1998; FRANCIS et al., 1999; LADD et al., 1996; LIU et al., 2000; PLOTSKY e MEANEY, 1993a e 1993b; SUCHECKI et al., 1993).

Tendo em vista os dados encontrados na literatura até o momento deste estudo, bem como os trabalhos prévios de nosso laboratório, espera-se obter uma confirmação dos dados já encontrados quanto à atenuada resposta de medo inato de animais manipulados. Também é esperado que animais manipulados manifestem, da mesma forma, sua resposta de medo aprendido reduzida, pois embora os mecanismos moduladores destes dois

paradigmas de medo não sejam exatamente os mesmos, já foram retratadas alterações neuroendócrinas específicas em ambos. Supõe-se que animais submetidos à separação materna apresentem suas respostas de medo inato e aprendido intensificadas, tendo em vista a maior reatividade neuroendócrina observada nestes animais.

O envolvimento da dopamina na regulação neural das respostas de estresse mediadas pelo eixo HPA vem sendo estudado há algum tempo (SZAFARCZYK et al., 1988; CASOLINI et al., 1993). É sabido que a exposição de animais a estímulos condicionados, que evocam respostas de medo, aumenta o metabolismo de dopamina na VTA, provavelmente devido a um aumento da taxa de disparo destes neurônios (DEUTCH et al., 1985). Esta resposta de medo condicionado é bloqueada por lesões excitotóxicas dos neurônios dopaminérgicos da VTA, bem como por infusão de agonista de receptor dopaminérgico $D_{2/3}$ (MUNRO e KOKKINIDIS, 1998), e induzida por eletroestimulação nesta área ou no complexo amigdalóide (BOROWSKI e KOKKINIDIS, 1997). Também é conhecido o fato de que animais submetidos a intervenções no período hiporresponsivo apresentam não só alterações neuroquímicas e estruturais no eixo HPA (PLOTSKY e MEANEY, 1993a, 1993b), como também alterações nas concentrações de monoaminas em diversas áreas relacionadas às respostas de medo (ANDERSEN et al., 1999; PAPAIOANNOU et al., 2002; LIU et al., 2000).

Partindo do princípio que animais manipulados apresentam alterações no eixo HPA no sentido de uma menor responsividade ao estresse, e considerando que a o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico sofre influências das respostas do eixo quando em situações de estresse (SZAFARCZYK et al., 1988; CASOLINI et al., 1993) em um sentido direto, espera-se que animais manipulados apresentem uma menor imunomarcagem de dopamina neste sistema. Tendo em vista que a separação materna gera efeitos exatamente inversos, no que se refere a responsividade do eixo HPA em estresse, espera-se uma alteração no sistema dopaminérgico no sentido d uma maior imunomarcagem.

Considerando esta inter-relação entre experiências aversivas

precoces, responsividade ao estresse e sistema dopaminérgico, buscou-se investigar as respostas comportamentais de medo, inato e aprendido, de animais manipulados e separados. Bem como possíveis alterações na dopamina do sistema mesocorticolímbico e nigroestriatal destes animais que poderiam estar atuando nestas alterações.

Objetivos



2 OBJETIVOS

Busca-se avaliar os efeitos tardios de dois modelos de estresse neonatal: manipulação e separação materna, sobre a expressão do medo em ratos machos adultos sobre dois diferentes paradigmas: medo inato e aprendido. Esta pesquisa também propõe a investigação dos efeitos destes modelos de intervenção precoce sobre a imunomarcagem de dopamina do sistema mesencefálico, que possui papel importante na modulação das reações comportamentais em resposta ao estresse.

Para tal pretende-se realizar o condicionamento clássico pavloviano para avaliar as reações de medo aprendido, o teste de campo aberto para avaliar respostas de medo inato e a técnica de imunistoquímica para demonstrar a tirosina hidroxilase, enzima precursora da dopamina, na VTA, e SNCo.

Material e Métodos



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da variedade Wistar provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos no biotério sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas com início da fase escura às 17 horas e 30 minutos. A temperatura do biotério foi mantida constante em torno de 22°C. Todos os animais tiveram livre acesso à água e comida durante todo o período desta pesquisa.

Fêmeas prenhas foram trazidas do biotério central da UFRGS ao biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento, onde eram aleatoriamente divididas nos grupos experimentais. O dia do parto das ratas foi controlado rigorosamente. Para a realização de todos os experimentos foi utilizado um total de 111 animais provenientes de 48 ninhadas distintas. Os animais eram submetidos a apenas um dos experimentos.

3.2 Tratamento

O desenho experimental consistiu em 3 grupos: controles, manipulados e separados (privados da mãe). Um rato de cada uma das ninhadas de cada grupo foi utilizado em cada experimento. A seguir descreve-se os referidos grupos experimentais:

a) *Grupo I - CONTROLES* - os animais não foram tocados pelos experimentadores nem pelos tratadores durante os 10 primeiros dias de idade, tendo somente suas caixas trocadas no 6º dia após o nascimento sem que o ninho fosse afetado.

b) *Grupo II - MANIPULADOS* - os animais foram retirados da caixa por 3 minutos e gentilmente manipulados pelo experimentador por 1 minuto uma vez por dia durante os 10 primeiros dias de vida. No 6º dia após o nascimento suas caixas foram trocadas sem que o ninho fosse afetado.

c) *Grupo III - SEPARADOS* - os animais foram separados da mãe e mantidos em estufa com controle de temperatura ($32\pm 1^\circ\text{C}$) por 3 horas uma vez por dia durante os 10 primeiros dias de vida. Estes animais também tiveram suas caixas trocadas no 6º dia após o nascimento sem que o ninho fosse afetado.

O dia do parto de cada ninhada foi rigorosamente controlado e considerado nesta pesquisa como dia 0. No primeiro dia pós-parto as ninhadas foram aleatoriamente divididas nos grupos experimentais e padronizadas em 8 filhotes por mãe, mantendo-se sempre 1 ou 2 fêmeas por ninhada. Após o período de intervenção neonatal (dias 1 a 10), os ratos permaneceram com a mãe até o dia 21 pós-parto, quando então foram desmamados e mantidos em caixas com os irmãos do mesmo sexo sendo tratados segundo a rotina padrão do biotério. Todos os machos da ninhada foram mantidos juntos na caixa até o

dia 46, quando eram divididos em duas caixas e mantidos até a idade adulta, quando eram submetidos aos diferentes experimentos. Foi utilizado um total de 48 ninhadas, onde cada irmão era submetido a um único experimento, de forma que a amostra de cada teste foi formada por animais não pertencentes à mesma ninhada (não-irmãos). Um registro dos pesos de todos os animais foi realizado nos dias 21, 30, 46 e 90. Na primeira pesagem, animais com uma variação de peso maior que 30% da média esperada foram descartados a fim de evitar a interferência de possíveis patologias

3.3 Desenho Experimental

Os dados provenientes desta pesquisa foram advindos de duas abordagens experimentais: análise comportamental e análise imunistoquímica. Na primeira, buscou-se avaliar dois paradigmas de medo, o inato e o aprendido, e para tanto, foram realizados dois experimentos: o teste do campo aberto e o condicionamento clássico pavloviano, ou medo condicionado. Em cada experimento comportamental foram utilizados 48 ratos não irmãos, 16 em cada grupo experimental (controle, manipulado e separado). Na análise imunistoquímica utilizaram-se 5 ratos de cada grupo experimental, perfazendo uma amostra total de 15 ratos.

A seguir um esquema do desenho experimental desta pesquisa



Figura 4: Esquema de ilustração do desenho experimental da pesquisa

3.4 Análise Comportamental

Ambos os experimentos da análise comportamental foram realizados em ambiente iluminado durante a fase escura do ciclo do biotério. Os animais eram avaliados quando completavam 90 - 110 dias de vida. Uma vez alcançada a idade mencionada, um animal de cada ninhada era submetido a um dos testes comportamentais, pesado e marcado, para então ser devolvido para a caixa moradia.

3.4.1 Medo Aprendido

Os animais eram retirados da "caixa-moradia", e transportados para o local do experimento (previamente climatizado à temperatura do biotério) em caixas menores. Foi estipulado o tempo de 20 minutos para a adaptação à sala do experimento, tempo durante o qual os animais permaneciam na caixa do transporte com comida e água. Após este período os animais eram colocados na caixa de condicionamento, onde permaneciam ainda por 5 minutos para a adaptação à caixa antes de iniciar o condicionamento propriamente dito. Este período de adaptação foi introduzido afim de não produzir um condicionamento contextual, onde a própria caixa seria um dos estímulos neutros associados ao choque. Após o período de adaptação à caixa os ratos eram submetidos a um esquema de condicionamento reflexo (treino), que, neste experimento, compreendeu no pareamento repetitivo de dois estímulos neutros ou condicionados simultâneos (som -3000Hz a 30dB- e luz) com um estímulo aversivo incondicionado (choque elétrico - 0.8 mA). Foram realizadas, ao total, 10 apresentações do estímulo condicionado associado ao estímulo incondicionado, divididas em 2 sessões com 5 estimulações em cada, com intervalos de 20s entre cada emissão do pareamento (som - luz - choque) e um minuto entre cada sessão. Os estímulos condicionados foram emitidos por 5s sendo no último segundo associada ao choque, que teve, portanto, uma duração total de 1s, de acordo com a ilustração a seguir:

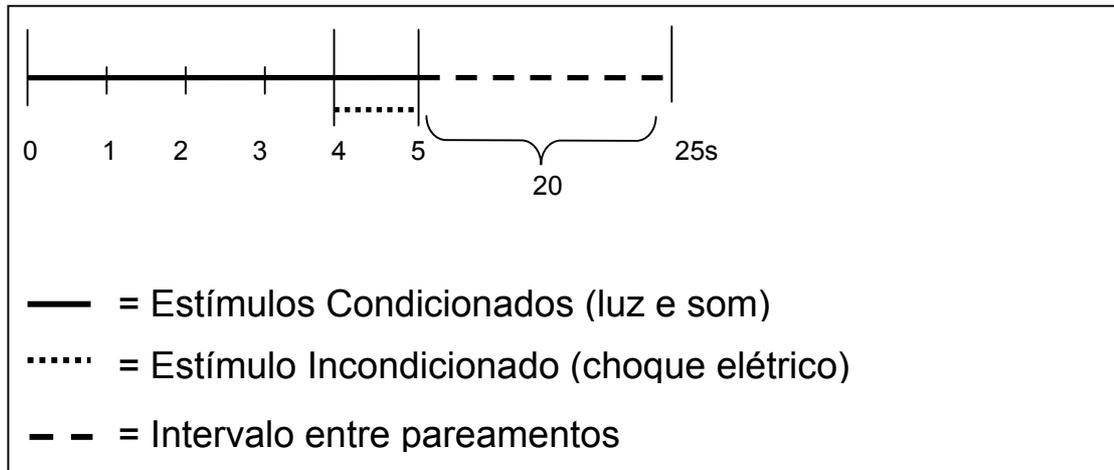


Figura 5: Ilustração do esquema de pareamentos de estímulos no treino do Medo Condicionado.

O teste foi realizado 24 horas após o condicionamento (treino), quando as respostas de alarme do medo aprendido foram registradas. Nesta segunda fase o animal foi recolocado na caixa de condicionamento e submetido a emissões dos estímulos neutros (sirene e luz), seguindo o mesmo esquema de 5 segundos de emissão com intervalos de 20 segundos por um período total de 30 minutos.

Treino e teste foram realizados com um animal de cada vez, sendo a análise dos dados realizada somente na fase do teste, onde os animais eram filmados (Figura 6). Posteriormente os comportamentos emitidos foram registrados através do programa Noldus® (Holanda) e os dados foram então submetidos à análise estatística para verificação de possíveis diferenças entre os grupos experimentais, conforme descrito adiante.

3.4.2 Medo Inato

Neste experimento seguiu-se a mesma rotina de transporte e

adaptação à sala do experimento citadas no experimento anterior. Após o período de adaptação o rato era retirado da caixa do transporte e colocado em um canto aleatório do campo aberto, virado sempre para a parede. Um cronômetro era acionado e o tempo de exploração estipulado foi de 5 minutos. Após este período o rato era retirado do campo e transportado para a caixa moradia. Antes de cada registro o campo era totalmente limpo com álcool 50%. Todo período de permanência do rato no campo foi filmado e os comportamentos registrados no programa Noldus® (Holanda) e submetidos à análise estatística para verificação de possíveis diferenças entre os grupos experimentais, conforme descrito a seguir.

3.5 Instrumentos

3.5.1 Caixa de Condicionamento

Para a realização do condicionamento reflexo foi utilizada uma Caixa de Condicionamento com medidas de 30 cm X 25 cm X 20 cm (Figuras 6 e 8) com dispositivos de emissão de som, luz (interna e externa) e corrente elétrica, que podiam ser controlados pelo experimentador e por um monitor eletrônico (Figura 7). Foram escolhidas as seguintes intensidades para os estímulos: 0,8 mA para o choque elétrico e a intensidade 7 para o estímulo sonoro, de 10 dB. A caixa possui dois sistemas de emissão de estímulo luminoso, um interno e outro externo à caixa, tendo sido escolhido o sistema de luz interno com intensidade 7. O assoalho da caixa é composto por barras metálicas condutoras de eletricidade com 0,5 cm de diâmetro distanciadas 1cm entre si (Figura 8). A emissão do estímulo elétrico é produzida por um gerador

de corrente constante que é controlado pelo experimentador. Um controlador de tempo e um contador do número de choques emitidos são apresentados em um visor digital.

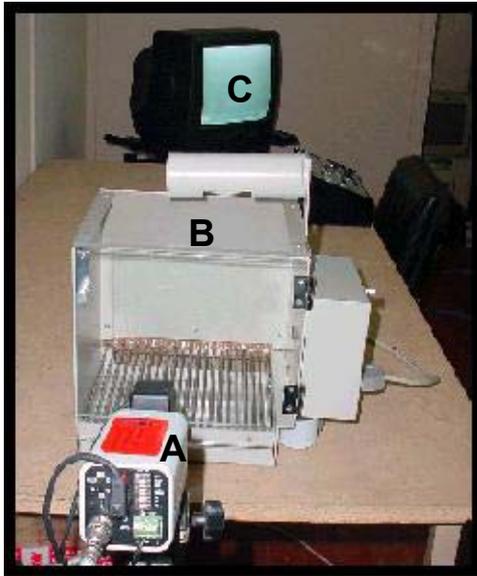


Figura 6: Disposição dos equipamentos do medo condicionado. A: câmera para captura do condicionamento. B: caixa de Skinner. C: vídeo para a gravação do registro e tv.

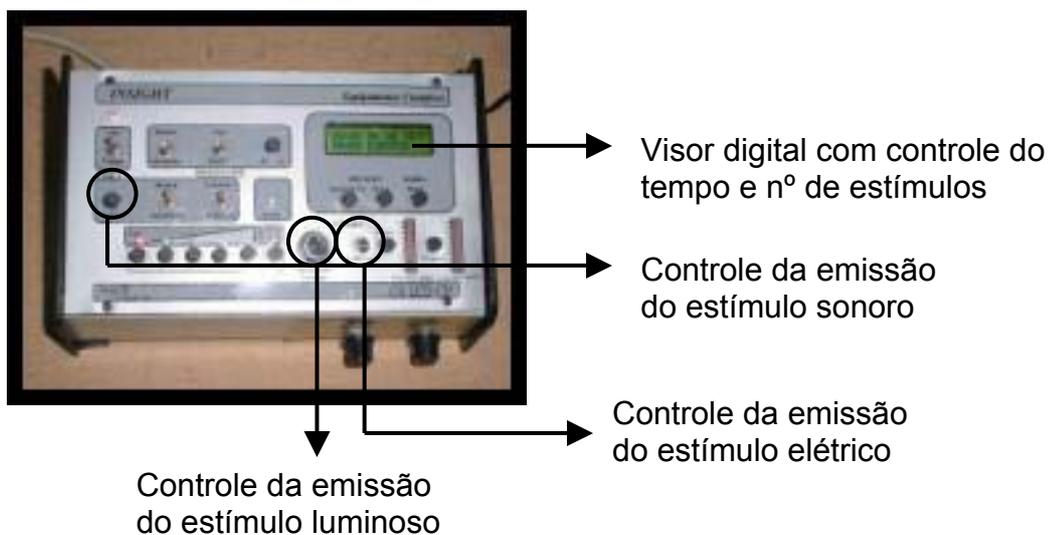


Figura 7: Monitor eletrônico usado no medo condicionado

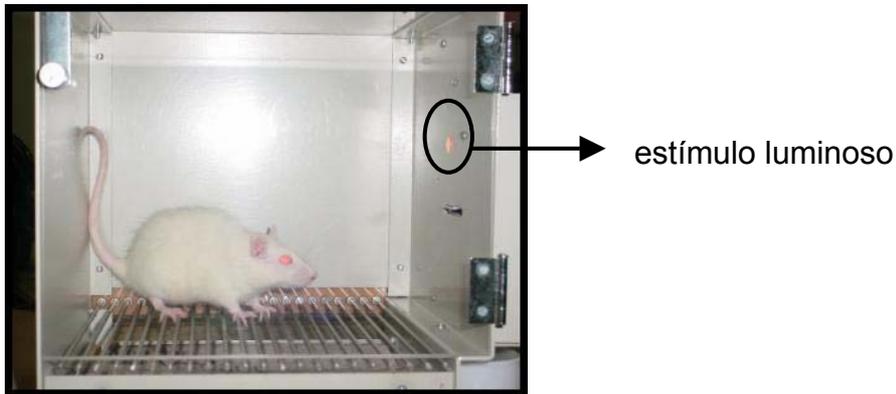


Figura 8: Caixa de Condicionamento

3.5.2 Campo Aberto

O campo aberto consiste em uma caixa de 1 m² (Figura 9) com paredes de 50 cm de altura e com sua base dividida com linhas brancas em quadrantes de 20 cm², perfazendo um total de 25 quadrantes, 16 laterais (próximos às paredes) e 9 centrais.

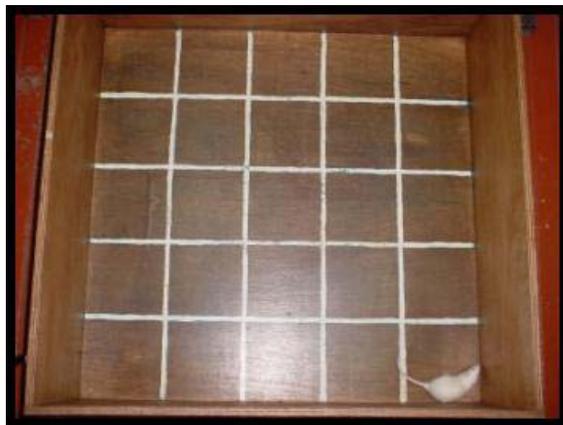


Figura 9: Campo Aberto

3.5 Imunoistoquímica

A Imunoistoquímica é uma técnica que proporciona a demonstração de diferentes componentes antigênicos dos tecidos, usando para isso anticorpos específicos e um conjunto de técnicas que permitem sua localização *in situ*, com ajuda de microscopia óptica ou eletrônica. As técnicas mais usadas são as chamadas indiretas, as quais empregam um segundo anticorpo (IgG) para localizar um primeiro anticorpo ou anticorpo específico (Peinado *et al.*, 1996). Ao completar 90-110 dias de vida uma amostra com 5 ratos de cada grupo experimental foi submetida à técnica Imunoistoquímica para a detecção da expressão da tirosina hidroxilase, enzima precursora na síntese de dopamina, na VTA e SNC, principais locais responsáveis pela produção de dopamina.

3.6.1 Preparação do tecido

A fixação por perfusão foi realizada conforme os protocolos adaptados de Peinado e colaboradores (1996). Os ratos foram injetados com tiopental sódico (100 mg/Kg, i.p.) e perfundidos através do coração com 100 ml de solução lavadora tamponada heparinizada, seguida por 200 ml de solução fixadora (paraformaldeído 4% - em tampão fosfato 0,1M pH 7,4). Os encéfalos foram removidos até cerca de 5 minutos e imediatamente mergulhados na mesma solução fixadora a 4°C por 4 horas. Imediatamente após a pós-fixação do tecido, os encéfalos foram colocados em 2 concentrações de solução crioprotetora (sacarose em tampão fosfato a 15% e 30% respectivamente) a 4°C até afundarem. Após a crioproteção, os encéfalos foram congelados num

recipiente com isopentano esfriado em nitrogênio líquido. Após o congelamento completo, os encéfalos foram conservados em freezer a -70°C . por 24 horas até serem cortados em secções coronais de $50\ \mu\text{m}$ de espessura em criostato (HM 505E, MICROM - EUA) a temperatura de -22°C . Todos os procedimentos foram realizados simultaneamente com todos os encéfalos dos 3 grupos experimentais, e os tempos de incubação em cada solução rigorosamente controlados.

Todas as secções representantes da extensão da região VTA-SN do mesencéfalo foram utilizadas no experimento, compreendendo uma área de $1,10\ \text{mm}$, à distância posterior ao bregma de $5,20\ \text{mm}$ até ao $6,30\ \text{mm}$ conforme o atlas de Paxinos e Watson (1997), perfazendo um total de 22 cortes por encéfalo. As secções foram mergulhadas em $4\ \text{ml}$ de solução de tampão fosfato salino (PBS) e cuidadosamente dissecados retirando-se todo o córtex cerebral e mantidas a 4°C por 12 horas até realização da técnica imunistoquímica.

3.6.2 Técnica Imunistoquímica

SUBSTÂNCIA	TEMPO DE ENCUBAÇÃO
Banho PBS-T	15 min
Banho PBS	15 min
Banho PBS	15 min
Peróxido de hidrogênio (0,2%)	15 min
Soro normal	30 min
Anti-corpo primário anti - TH (1:5.000)	<i>over night</i>
Banho PBS	15 min
Banho PBS	15 min
Anti-corpo secundário (1:200)	30 min

Banho PBS	15 min
Banho PBS	15 min
Kit ABC	30 min
Banho PBS	15 min
Banho PBS	15 min
DAB	10 min
Peróxido de hidrogênio	1 min
Banho PBS	15 min
Banho PBS	15 min
Montagem dos cortes nas lâminas	
Secagem das lâminas	<i>over night</i>
Desidratação do tecido	
Entellán e lamínula	

Tabela 1: Protocolo da técnica de imunistoquímica

3.6.3 Densitometria Óptica

Após o procedimento da técnica imunistoquímica, foram obtidas imagens digitalizadas dos cortes histológicos localizados entre as coordenadas anteriormente citadas, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1997) compreendendo as sub-regiões da VTA e SNCo, (coexistentes num mesmo plano). Utilizou-se o programa *Image-Pro Plus 4.1* (Media Cybernetics, EUA) conectado a uma câmera *Pro-series High Performance CCD* acoplada ao microscópio (Nikon Eclipse E-600). O aumento utilizado foi de 40x. O processo de captura das imagens foi realizado de forma a manterem-se constantes todas as variáveis de brilho e contraste e configurações dos equipamentos (microscópio e câmera filmadora). As imagens digitalizadas foram armazenadas como arquivos do tipo *TIFF* e convertidas para uma escala de cinza (8 bits), com níveis de 0 – 255. Três quadrados de área de 19,575 μm^2 (área de interesse - AOI) foram sobrepostos em locais aleatórios na imagem de

cada sub-região estudada, e a densidade óptica de cada AOI foi medida para posterior análise estatística (Figura 10). O tamanho da AOI foi determinado de forma que fosse possível a inserção de três AOIs em qualquer corte do intervalo estudado sem que houvesse nenhuma sobreposição. A densidade óptica do fundo, ou não específica, dos cortes estudados, também teve sua densidade óptica quantificada (Figura 11) e utilizada para corrigir as medidas da densidade óptica da VTA e SNCo. A seguir, a fórmula utilizada para medir a DO, de acordo com Rasia-Filho e colaboradores (2002).

$$OD_{(x,y)} = \left\{ \frac{(DO_{fundo(x,y)} - PRETO) - (INTENSIDADE_{(x,y)} - PRETO) / (INCIDENTE - PRETO)}{255} \right\} \times 100$$

Onde, $DO_{fundo(x,y)}$ representa a intensidade em $pixel_{(x,y)}$ do fundo inespecífico; PRETO é a intensidade gerada quando nenhuma luz atravessa o tecido; $INTENSIDADE_{(x,y)}$ é a intensidade em $pixel_{(x,y)}$ e INCIDENTE é a intensidade da luz que incide no material. O resultado obtido representa a média de todos os pixels da área selecionada em uma escala de 100%.

Foram analisados 15 encéfalos, pertencentes a cada grupo experimental (Controle = 5, Manipulado = 5 e Separado = 5). Cada sub-área (VTA e SNCo) foi levantada separadamente, a partir de 22 seções ($50 \mu m$) em ambos hemisférios, totalizando 44 imagens analisadas. Em cada imagem, 3 AOIs (não sobrepostas) foram inseridas dentro dos limites previamente estabelecidos de cada sub-região. O experimentador realizou o levantamento dos dados sem conhecimento a respeito de qual grupo experimental pertencia cada imagem analisada.

Os resultados obtidos representam a média da densitometria óptica dos cortes de cada sub-região por animal analisado. Estes dados foram transferidos para o programa estatístico *GraphPad Prism Project*® (EUA). Todos os dados foram submetidos à estatística descritiva com Média \pm Erro Padrão da Média ($X \pm EPM$) e, para a verificação de diferenças entre os grupos,

foi utilizado o teste ANOVA de uma via, com o teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls quando necessário. Na interpretação dos resultados, foram consideradas significativas as diferenças com índice de significância menor que 0,05.

A seguir duas ilustrações para exemplificar o processo de captura das imagens histológicas realizada pelo programa *Image-Pro Plus* (EUA). Na figura 10 mostra-se a inserção de uma das três AOI na região analisada (SNCo) para a quantificação da DO neste ponto, na figura 11, uma exemplificação da quantificação da DO em um ponto do fundo inespecífico para posterior correção do valor da DO das áreas de interesse.

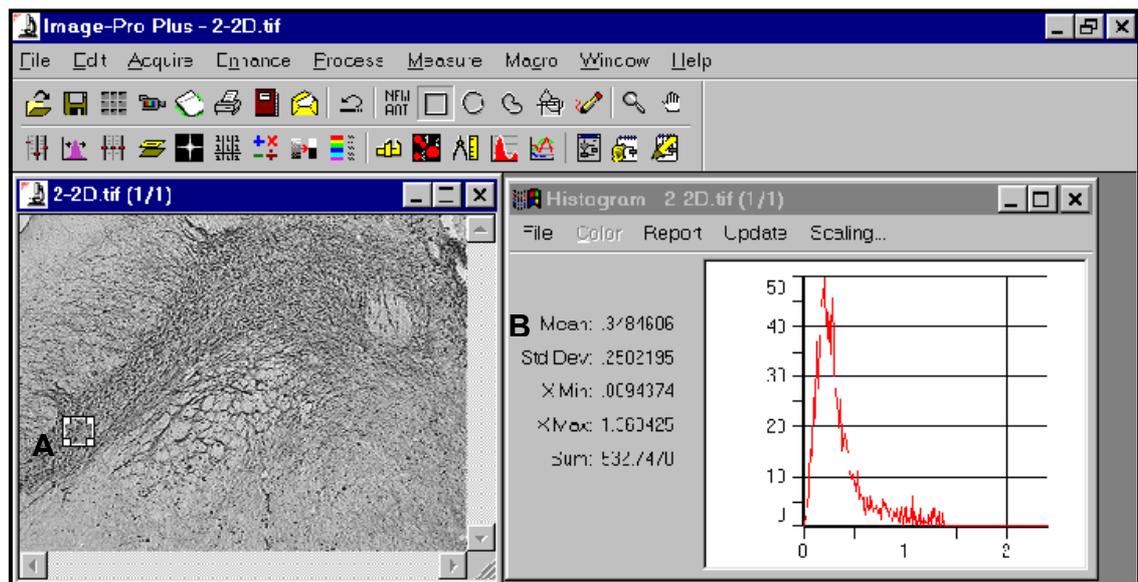


Figura 10: Exemplificação da quantificação da DO de uma AOI na SNCo. A: AOI; B: DO média da AOI.

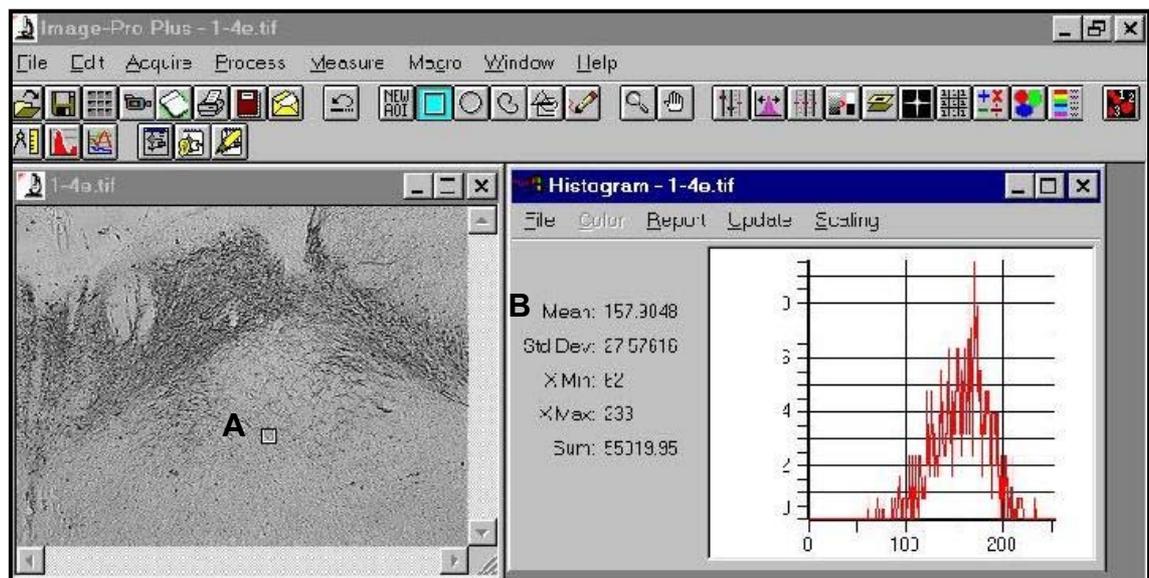


Figura 11: Exemplificação da inserção da AOI em um fundo inespecífico para mensuração da DO para posterior correção. A: AOI; B: DO média da AOI.

O fluxograma abaixo sumariza todos os procedimentos realizados para verificar a intensidade de marcação da TH no complexo VTA-SNCo.

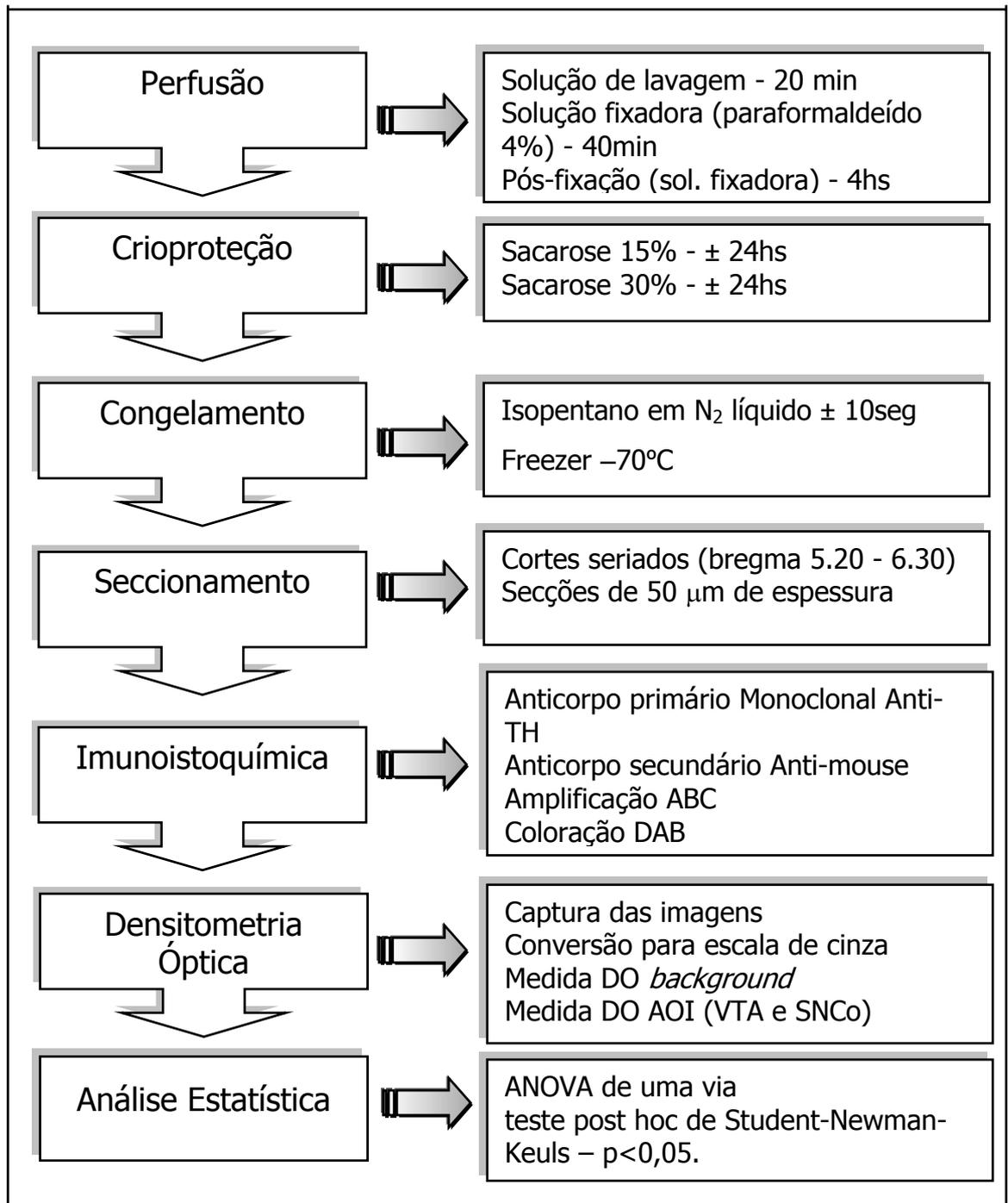


Figura 12: Esquema ilustrando os procedimentos para técnica imunoistoquímica.

3.7 Análise Estatística

Todos os dados foram submetidos tanto à estatística descritiva quanto inferencial. A Média \pm Erro Padrão da Média ($X \pm EPM$) para os dados paramétricos, e Mediana \pm Intervalo Inter-quartil - 25% ($md \pm Q1$) para dados não-paramétricos de cada grupo experimental. A estatística inferencial foi utilizada para a verificação de diferenças entre os grupos. As latências dos comportamentos foram consideradas dados não-paramétricos e tratados utilizando-se o teste de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis, com o teste *post-hoc* de Dunn para comparações múltiplas entre grupos. Os demais dados apresentaram uma distribuição normal e foram testados pelo teste da análise da variância (ANOVA) de uma via com teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas entre os grupos. O índice de confiança aceito em todos os testes foi de 95% sendo o considerado significativo o valor de p menor que 0,05.

Resultados



4 RESULTADOS

4.1 Resultados Comportamentais

4.1.1 Medo Aprendido

A análise da reação de medo aprendido foi realizada na fase teste, 24h depois dos animais terem sido submetidos ao condicionamento clássico. Foram avaliadas suas reações comportamentais frente à exposição aos estímulos condicionados som e luz. Os seguintes comportamentos foram analisados: 1) Imobilização (definido por: imobilização completa, contração muscular, arqueamento da coluna e/ou exoftalmia ou piloereção); 2) Escanear (explorar o ambiente olhando e cheirando); 3) Cheirar (cheirar pontos específicos da caixa); 4) *Rearing* (explorar o ambiente sobre as patas posteriores); 5) Autolimpeza (limpar-se e/ou coçar-se); 6) Deitar (deitar sobre as 4 patas sem apresentar as características citadas na imobilização). Tais comportamentos foram avaliados quanto sua duração e frequência. Além destes, também foi considerado: 7) Defecação (número de bolos fecais encontrados na caixa após a sessão do teste); 8) Latência do comportamento imobilização; 9) Latência do comportamento deitar; 10) Índice de imobilizações coincidentes com o estímulo neutro (percentagem de imobilizações em relação ao total de emissões deste comportamento, que coincidiram, num intervalo de 5 segundos, com o estímulo neutro); 11) Latência de extinção do

condicionamento (considerada o tempo no qual o animal não apresenta o comportamento de imobilização frente ao estímulo neutro (ou até 5 segundos após sua aparição) pela terceira vez consecutiva).

Estes dados, com exceção da defecação, foram coletados através da análise da fita com o auxílio do programa Noldus® (EUA) e após, transferidos para o programa *GraphPad Prism Project* (EUA) para a análise estatística descritiva e inferencial como citado anteriormente. Para a interpretação dos gráficos, diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão indicadas por letras diferentes (**a** e **b**), enquanto letras iguais indicam a ausência desta diferença.

Latência Imobilização

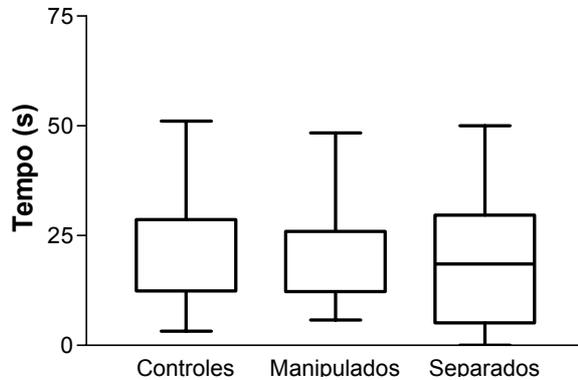


Figura 13: Latência de imobilização dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido. Não houve diferença significativa ($p = 0.94$) entre os grupos Controle ($md \pm Q1$) ($20,2 \pm 12$), Manipulado ($18,4 \pm 12$) e Separado ($18,5 \pm 5$) pelo teste Kruskal Wallis ($H=0,10$).

Latência de Extinção

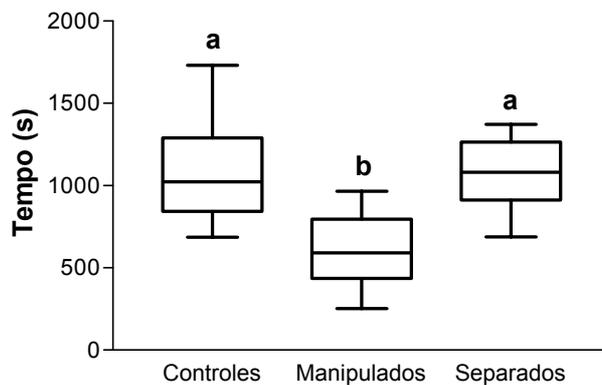


Figura 14: Latência da extinção do condicionamento dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido. Houve diferença significativa ($P < 0.0001$) entre os grupos pelo teste Kruskal Wallis ($H=21,64$). No teste de comparações múltiplas de Dunn, houve diferença entre os grupos Controle ($md \pm Q1$; 1072 ± 843), e Manipulado (591 ± 434) com $p < 0.001$ e Manipulado e Separado (1080 ± 911), com $p < 0,001$.

Duração da Imobilização

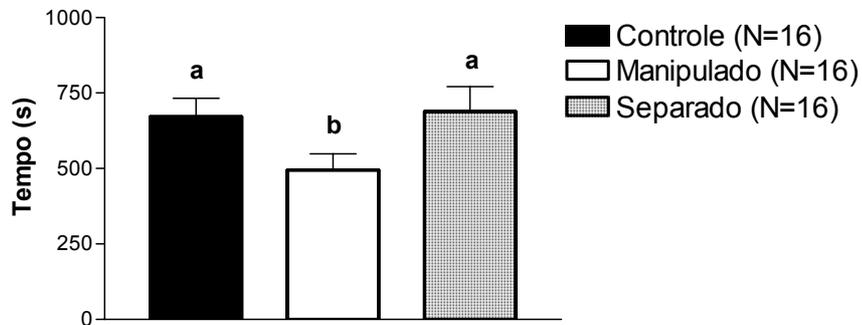


Figura 15: Duração da imobilização dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido. Houve diferença significativa ($p=0,02$) entre os grupos pelo teste ANOVA ($F=4,17$). No pós-teste de comparações múltiplas Student–Newman–Keuls houve diferença entre os grupos Controle ($M \pm EPM$, 718 ± 73) e Manipulado (491 ± 54) com $p<0,05$ e Manipulado e Separado (734 ± 74) com $p<0,05$.

Frequência de Imobilização

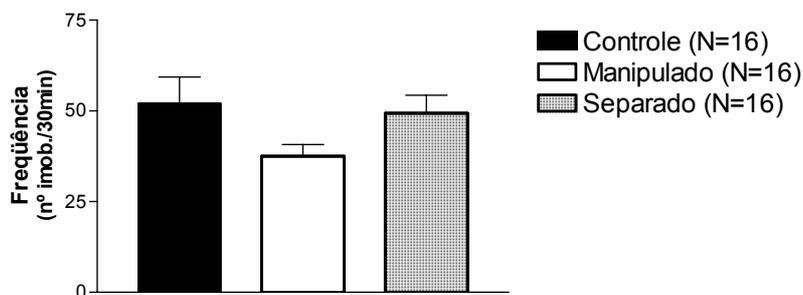


Figura 16: Frequência da imobilização dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido. Não houve diferença significativa ($p=0,14$) entre os grupos Controle (52 ± 7), Manipulado ($37,5 \pm 3$) e Separado ($49,3 \pm 5$) pelo teste ANOVA ($F=2,02$).

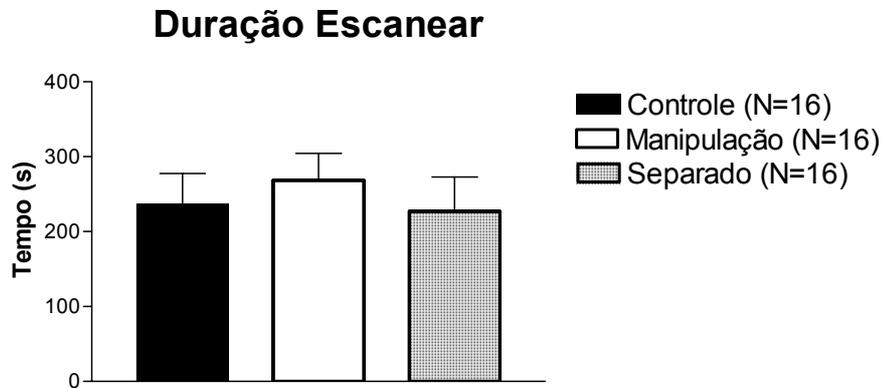


Figura 17: Duração do comportamento escanear dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido. Não houve diferença significativa ($p=0,14$) entre os grupos Controle (237 ± 41), Manipulado (269 ± 36) e Separado (227 ± 46) pelo teste ANOVA ($F=0,28$).

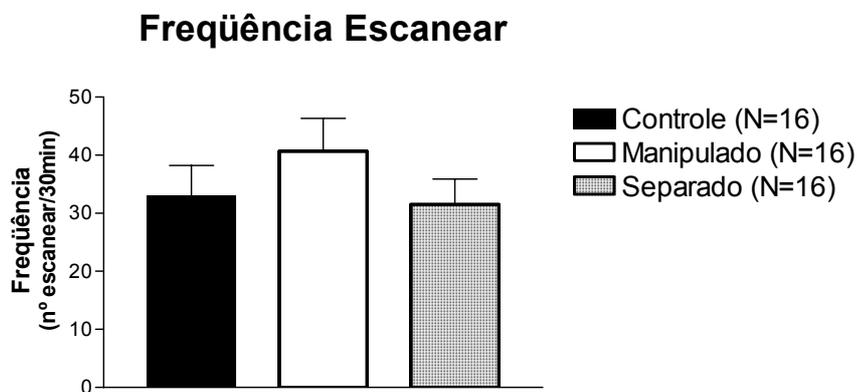


Figura 18: Frequência do comportamento escanear dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido. Não houve diferença significativa ($p = 0,6$) entre os grupos Controle (33 ± 5), Manipulado (41 ± 6) e Separado (31 ± 4) pelo teste ANOVA ($F=0,91$).

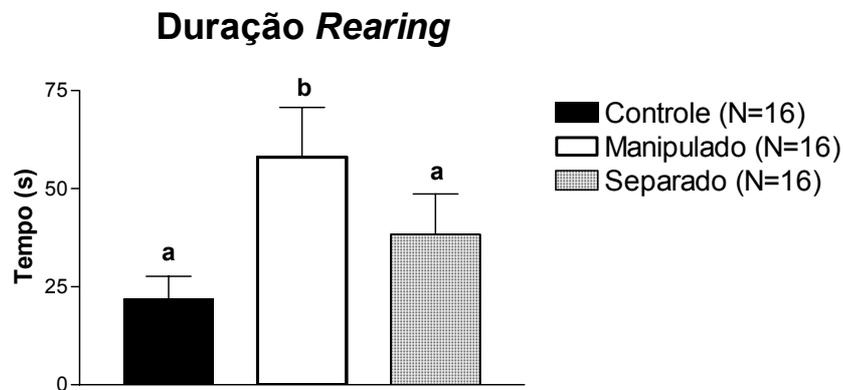


Figura 19: Duração do comportamento *rearing* dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido. Houve diferença significativa ($p=0,02$) entre os grupos pelo teste ANOVA ($F=3,34$). No pós-teste de comparações múltiplas Student–Newman–Keuls houve diferença entre os grupos Controle (22 ± 6) e Manipulado (58 ± 13) com $p<0,05$ e Manipulado e Separado (38 ± 10) com $p<0,05$.

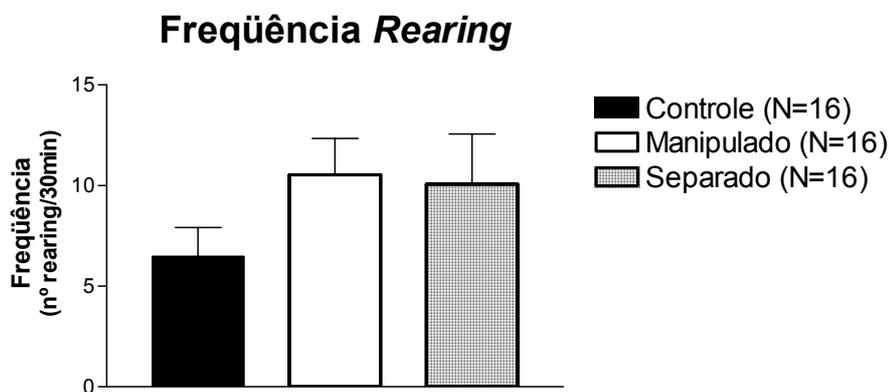


Figura 20: Frequência do comportamento *rearing* dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido. Não houve diferença significativa ($p=0,2$) entre os grupos Controle ($6,4 \pm 1$), Manipulado ($10,5 \pm 2$) e Separado (10 ± 2) pelo teste ANOVA ($F=1,27$).

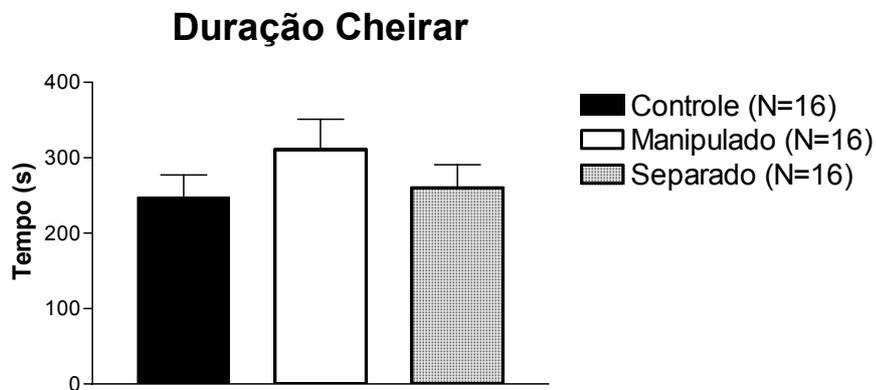


Figura 21: Duração do comportamento cheirar dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido. Não houve diferença significativa ($p=0,3$) entre os grupos Controle (247 ± 30), Manipulado (311 ± 40) e Separado (260 ± 31) pelo teste ANOVA ($F=0,97$).

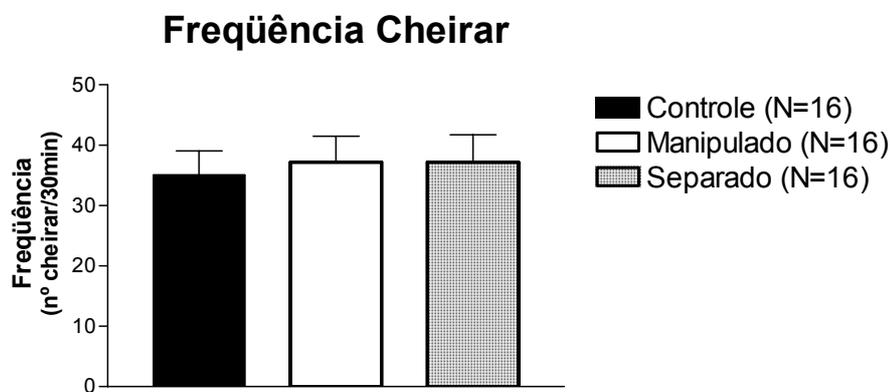


Figura 22: Freqüência do comportamento cheirar dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido. Não houve diferença significativa ($p=0,9$) entre os grupos Controle ($35,0 \pm 4$), Manipulado ($37,2 \pm 4$) e Separado ($37,2 \pm 4$) pelo teste ANOVA ($F=0,08$).

Duração Autolimpeza

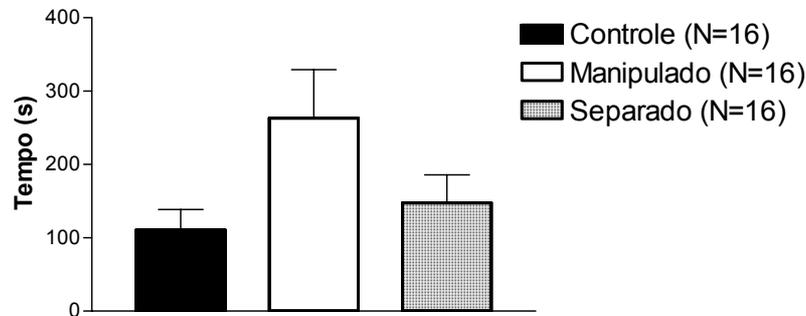


Figura 23: Duração do comportamento autolimpeza dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido. Não houve diferença significativa ($p=0,06$) entre os grupos Controle (111 ± 27), Manipulado (263 ± 66) e Separado (147 ± 38) pelo teste ANOVA ($F=2,94$).

Frequência Autolimpeza

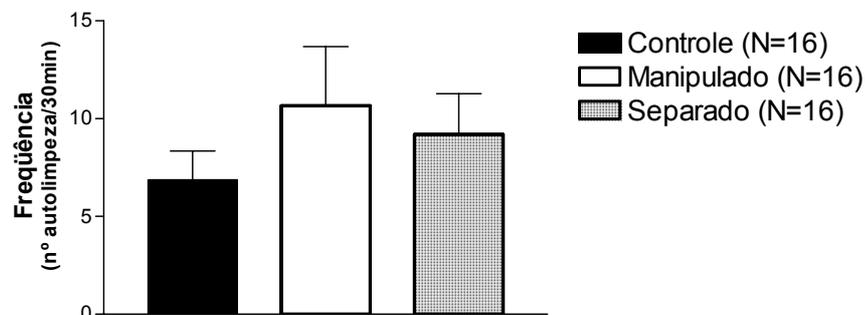


Figura 24: Frequência do comportamento autolimpeza dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido. Não houve diferença significativa ($p=0,4$) entre os grupos Controle ($6,8 \pm 1$), Manipulado ($10,6 \pm 3$) e Separado ($9,2 \pm 2$) pelo teste ANOVA ($F=0,70$).

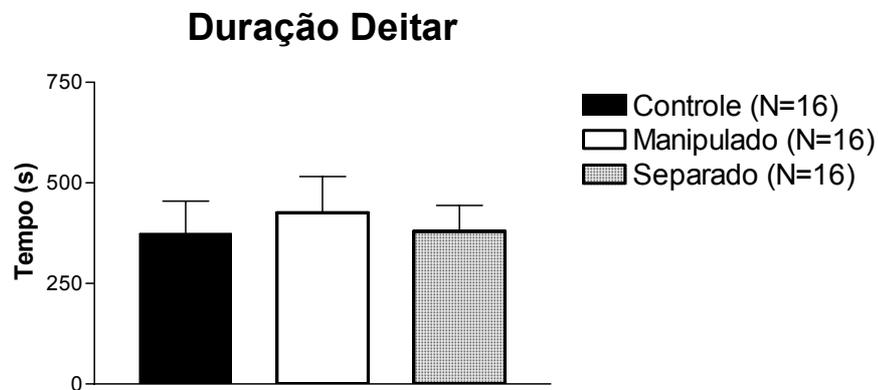


Figura 25: Duração do comportamento deitar dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido. Não houve diferença significativa ($p=0,8$) entre os grupos Controle (373 ± 81), Manipulado (426 ± 90) e Separado (379 ± 65) pelo teste ANOVA ($F=0,13$).

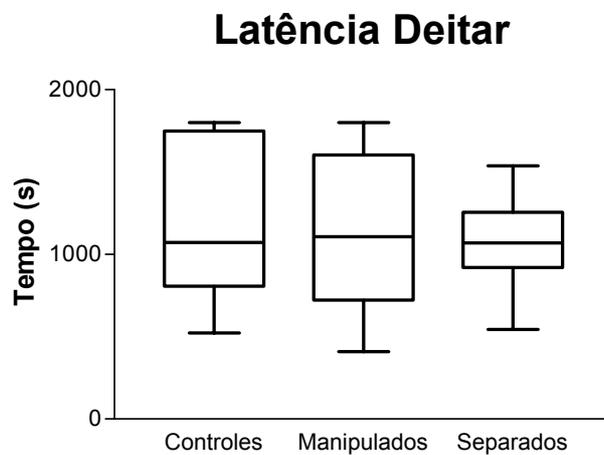


Figura 26: Latência do comportamento deitar dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido. Não houve diferença significativa ($p = 0,78$) entre os grupos Controle (md ± Q1, 1072 ± 807), Manipulado (1108 ± 721) e Separado (1069 ± 919) pelo teste Kruskal Wallis ($H=0,49$).

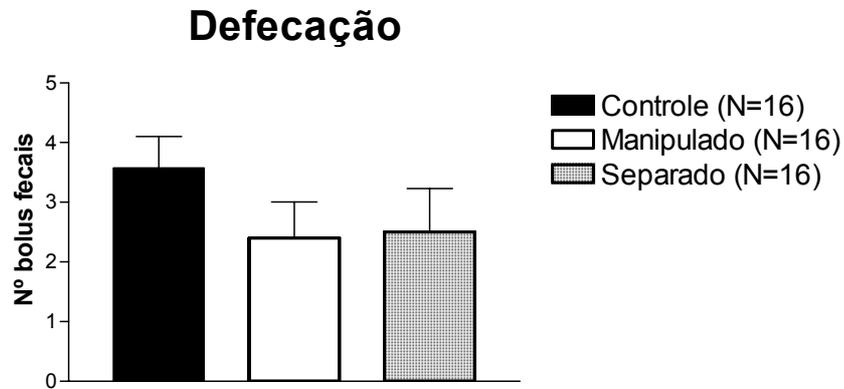


Figura 27: Defecação dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido. Não houve diferença significativa ($p=0,3$) entre os grupos Controle ($3,5 \pm 0,5$), Manipulado ($2,4 \pm 0,6$) e Separado ($2,5 \pm 0,7$) pelo teste ANOVA ($F=1,20$).

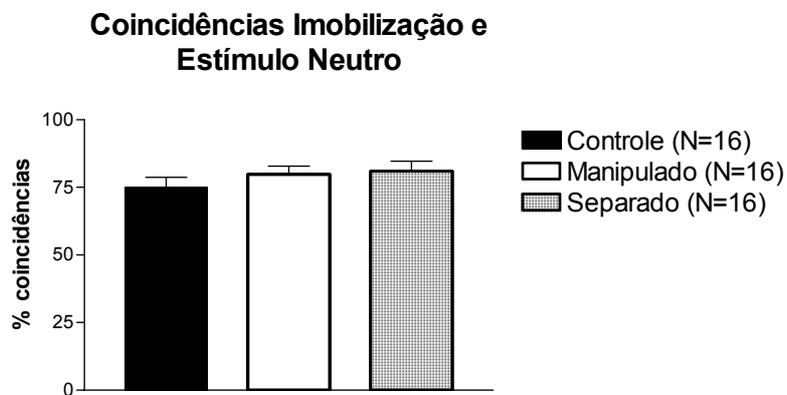


Figura 28: Índice de coincidências entre imobilização e estímulo neutro dos grupos controle, manipulado e separado, no medo aprendido.

4.1.2 Medo Inato

Todo o período de permanência do rato no campo foi filmado e posteriormente analisado através do programa Noldus®. Os animais eram colocados aleatoriamente em um dos quatro quadrantes do canto do campo orientados para as paredes. Os seguintes comportamentos foram analisados quanto sua duração e frequência: 1) Locomoção (troca de quadrante com as 4 patas), 2) Escanear (explorar o ambiente olhando e cheirando), 3) Cheirar (cheirar pontos específicos da caixa) *Rearing* (explorar o ambiente sobre as patas posteriores), 4) Autolimpeza (limpar-se e/ou coçar-se), 5) Defecação (número de bolus fecais presentes no campo após o tempo de permanência de cada rato). Além destes comportamentos, foram também consideradas: 6) Latência da locomoção, 7) Latência da primeira entrada do animal nos quadrantes centrais 8) frequência de cruzamentos para os quadrantes centrais e 9) Permanência nos quadrantes centrais do campo.

Todos os dados, com exceção da defecação, foram coletados através da análise da fita com o auxílio do programa Noldus® (Holanda) e posteriormente transferidos para o programa estatístico *GraphPad Prism Project*® (EUA). Todos os dados foram submetidos à estatística descritiva com Média \pm Erro Padrão da Média ($X \pm EPM$) ou Mediana \pm Intervalo Inter-quartil – 25% ($md \pm Q1$) e, para a verificação de diferenças entre os grupos, foram utilizados os testes ANOVA de uma via com o teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls e para os dados considerados não-paramétricos o teste Kruskal-Wallis com o teste *post-hoc* de Dunn. Na interpretação dos testes foram consideradas significativas as diferenças com índice de significância menor que 0,05. Para a interpretação dos gráficos, diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão indicadas por letras diferentes (**a** e **b**), enquanto letras iguais indicam a ausência desta diferença.

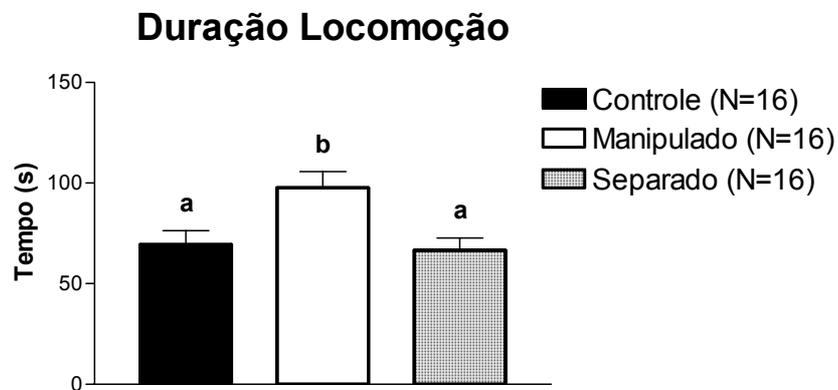


Figura 29: Duração da locomoção dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto. Houve diferença significativa ($p=0,005$) entre os grupos pelo teste ANOVA ($F=5,99$). No pós-teste de comparações múltiplas Student–Newman–Keuls houve diferença entre os grupos Controle ($M \pm EPM$; $69,4 \pm 7$) e Manipulado ($97,6 \pm 8$) com $p<0,01$ e Manipulado e Separado ($66,5 \pm 6$) com $p<0,01$.

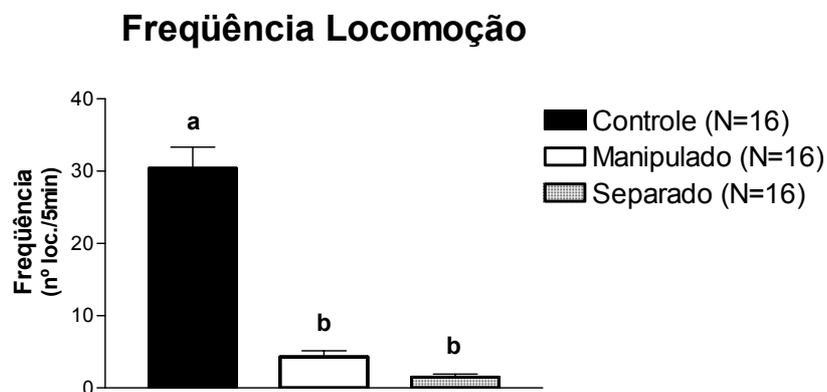


Figura 30: Frequência da locomoção dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto. Houve diferença significativa ($p=0,0001$) entre os grupos pelo teste ANOVA ($F=85,3$). No pós-teste de comparações múltiplas Student–Newman–Keuls houve diferença entre os grupos Controle ($30,4 \pm 3$) e Manipulado ($4,3 \pm 1$) com $p<0,001$ e Controle e Separado ($1,5 \pm 0,4$) com $p<0,001$.

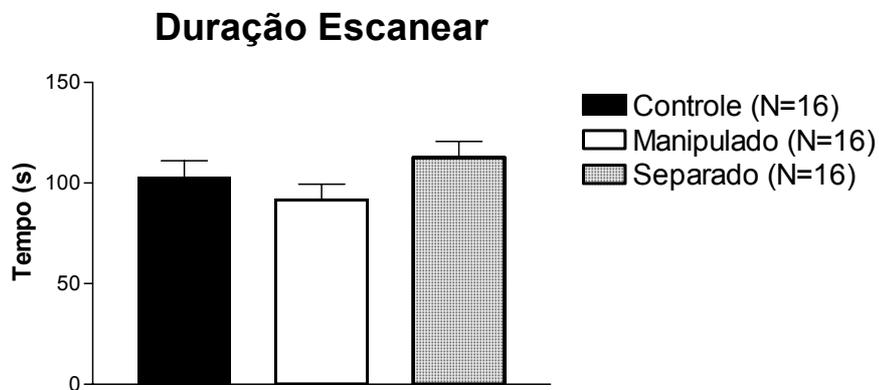


Figura 31: Duração do comportamento escanear dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto. Não houve diferença significativa ($p=0,18$) entre os grupos Controle (103 ± 8), Manipulado ($91,5 \pm 8$) e Separado (113 ± 8) pelo teste ANOVA ($F=1,77$).

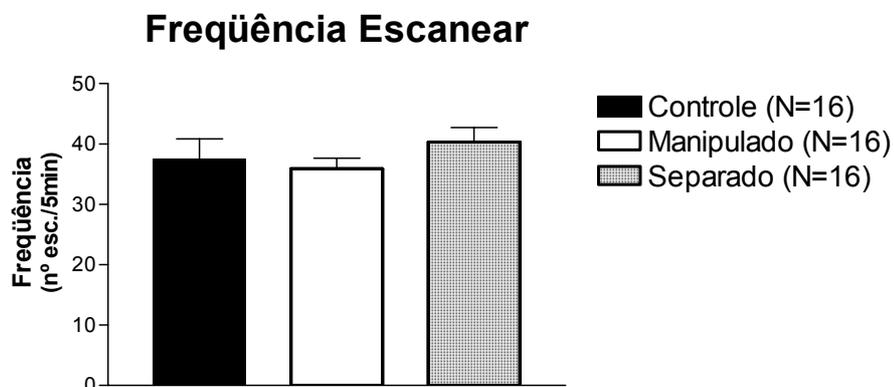


Figura 32: Freqüência do comportamento escanear dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto. Não houve diferença significativa ($p=0,46$) entre os grupos Controle ($37,4 \pm 3$), Manipulado ($35,8 \pm 2$) e Separado ($40,3 \pm 2$) pelo teste ANOVA ($F=0,77$).

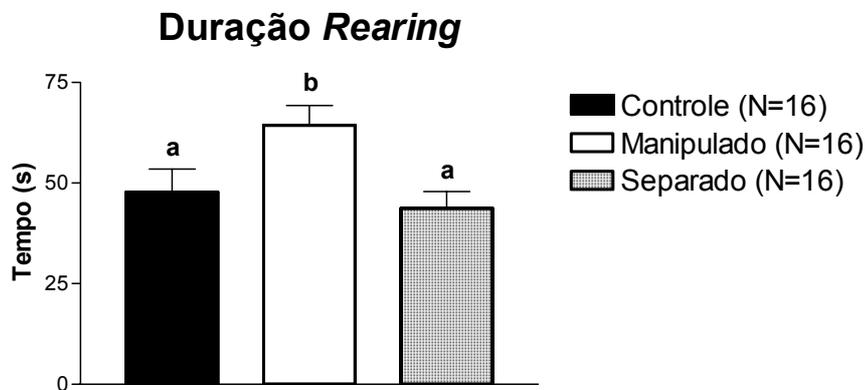


Figura 33: Duração do comportamento *rearing* dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto. Houve diferença significativa ($p=0,01$) entre os grupos pelo teste ANOVA ($F=4,95$). No pós-teste de comparações múltiplas Student–Newman–Keuls houve diferença entre os grupos Controle ($47,7 \pm 6$) e Manipulado ($64,3 \pm 5$) com $p<0,05$ e Manipulado e Separado ($47,7 \pm 4$) com $p<0,05$.

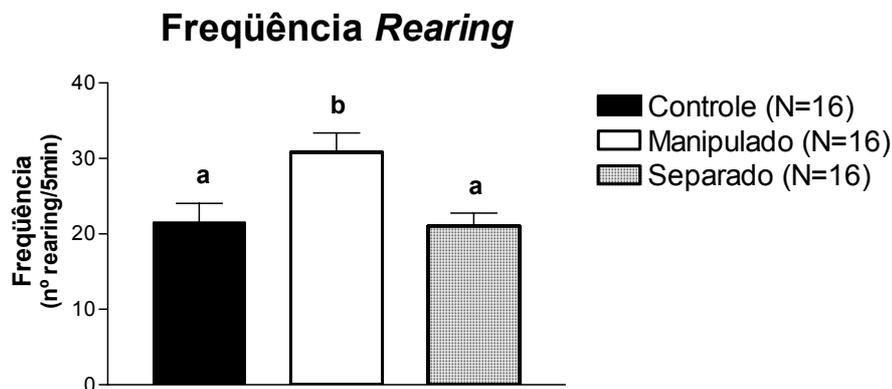


Figura 34: Frequência do comportamento *rearing* dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto. Houve diferença significativa ($p=0,005$) entre os grupos pelo teste ANOVA ($F=5,84$). No pós-teste de comparações múltiplas Student–Newman–Keuls houve diferença entre os grupos Controle ($21,5 \pm 2$) e Manipulado ($30,8 \pm 2$) com $p<0,01$ e Manipulado e Separado (21 ± 2) com $p<0,05$.

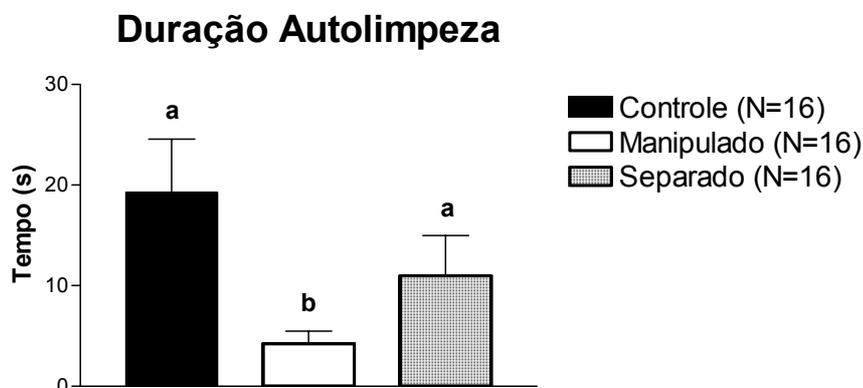


Figura 35: Duração do comportamento autolimpeza dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto. Houve diferença significativa ($p=0,03$) entre os grupos pelo teste ANOVA ($F=3,77$). No pós-teste de comparações múltiplas Student–Newman–Keuls houve diferença entre os grupos Controle ($19,2 \pm 5$) e Manipulado ($4,2 \pm 1$) com $p<0,05$.

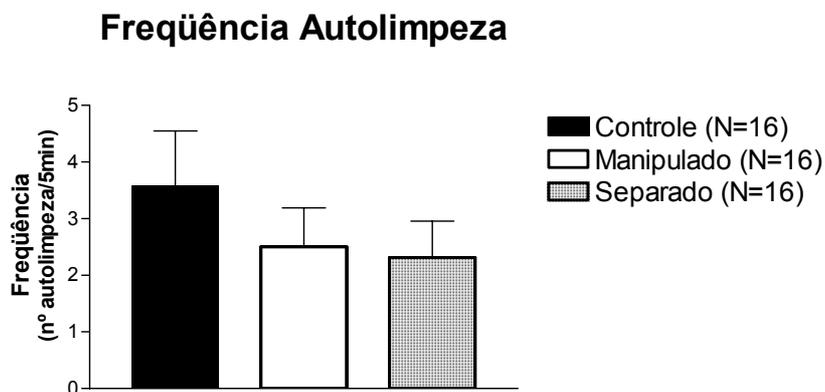


Figura 36: Frequência do comportamento autolimpeza dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto. Não houve diferença significativa ($p=0,47$) entre os grupos Controle ($3,5 \pm 1$), Manipulado ($2,5 \pm 1$) e Separado ($2,3 \pm 1$) pelo teste ANOVA ($F=0,75$).

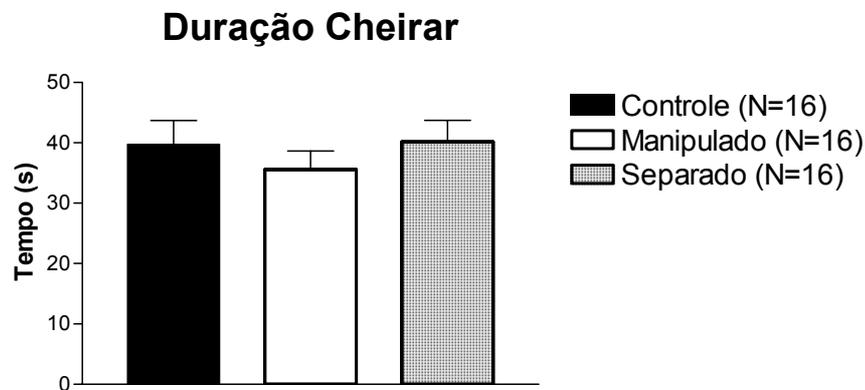


Figura 37: Duração do comportamento cheirar dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto. Não houve diferença significativa ($p=0,6$) entre os grupos Controle ($39,7 \pm 4$), Manipulado ($35,5 \pm 3$) e Separado ($40,1 \pm 3$) pelo teste ANOVA ($F=0,53$).

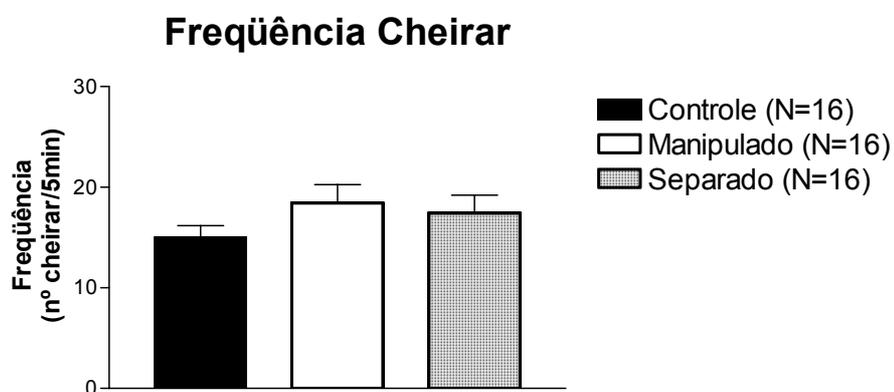


Figura 38: Frequência do comportamento cheirar dos grupos controle, manipulado e separado, no campo aberto. Não houve diferença significativa ($p=0,3$) entre os grupos Controle (15 ± 1), Manipulado ($18,4 \pm 2$) e Separado ($17,4 \pm 2$) pelo teste ANOVA ($F=1,12$).

Latência de Entrada no Centro do Campo Aberto

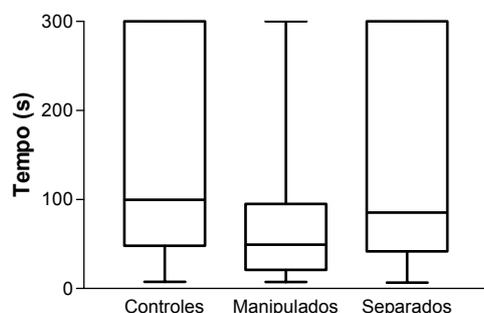


Figura 39: Latência de entrada no centro do campo aberto dos grupos controle, manipulado e separado. Não houve diferença significativa ($p=0,94$) entre os grupos Controle (md \pm Q1) ($99,5 \pm 48$), Manipulado ($49,3 \pm 21$) e Separado ($85,3 \pm 41$) pelo teste Kruskal Wallis ($H=3,58$).

Freqüência de Entrada no Centro do Campo Aberto

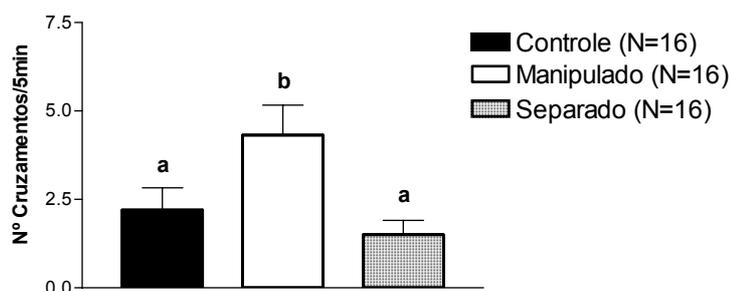


Figura 40: Freqüência de entrada no centro do campo aberto dos grupos controle, manipulado e separado. Houve diferença significativa ($p=0,01$) entre os grupos pelo teste ANOVA ($F=5,08$). No pós-teste de comparações múltiplas Student–Newman–Keuls houve diferença entre os grupos Controle ($2,2 \pm 0,6$) e Manipulado ($4,3 \pm 0,8$) com $p<0,05$ e dos grupos Manipulado e Separado ($1,5 \pm 0,4$) com $p<0,05$.

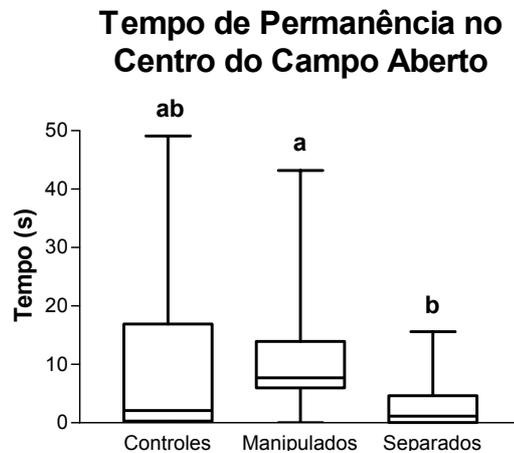


Figura 41: Tempo de permanência no centro do campo aberto dos grupos controle, manipulado e separado. Houve diferença significativa ($P < 0,007$) entre os grupos pelo teste Kruskal Wallis ($H = 9,86$). No teste de comparações múltiplas de Dunn, houve diferença entre os grupos Manipulado ($md \pm Q1$) ($7,7 \pm 6$) e Separado ($1,1 \pm 0$), com $p < 0,01$.

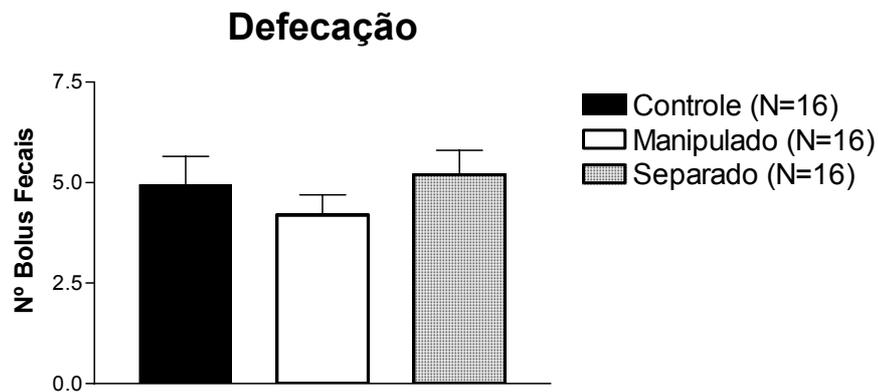


Figura 42: Defecação dos grupos controle, manipulado e separado no campo aberto. Não houve diferença significativa ($p = 0,5$) entre os grupos Controle ($4,9 \pm 0,7$), Manipulado ($4,2 \pm 0,5$) e Separado ($5,2 \pm 0,6$) pelo teste ANOVA ($F = 0,69$).

4.2 CONTROLE DOS PESOS

Tabela 2: Peso médio (Kg) dos grupos controle, manipulado e separado nas idades: 21, 46, 60 e 90 dias Não houve diferenças significativas dos pesos entre os grupos nas diferentes idades' (ANOVA, $p < 0,05$).

Grupos Idades	Controles	Manipulados	Separados
21 dias	39	42	41
46 dias	155	160	163
60 dias	224	230	219
90 dias	311	430	359

4.3 RESULTADOS DA IMUNOISTOQUÍMICA

4.3.1 Densitometria Óptica

Os dados da técnica Imunoistoquímica advêm de uma análise semiquantitativa de densidade óptica (DO). A DO foi obtida através da análise das imagens digitalizadas dos cortes histológicos imuno-marcados para tirosina hidroxilase através do programa *Image-Pro Plus 4.1* (Media Cybernetics, EUA). O valor final da DO de cada grupo advém de uma média das DOs de cada animal. Os dados advindos das duas sub-áreas estudadas (VTA e SNC_{Co}) foram avaliados separadamente. Foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) de uma via com teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls para a comparação entre os três grupos experimentais, com um índice de confiança de 95%.

Densidade Óptica (DO) Área Tegmental Ventral

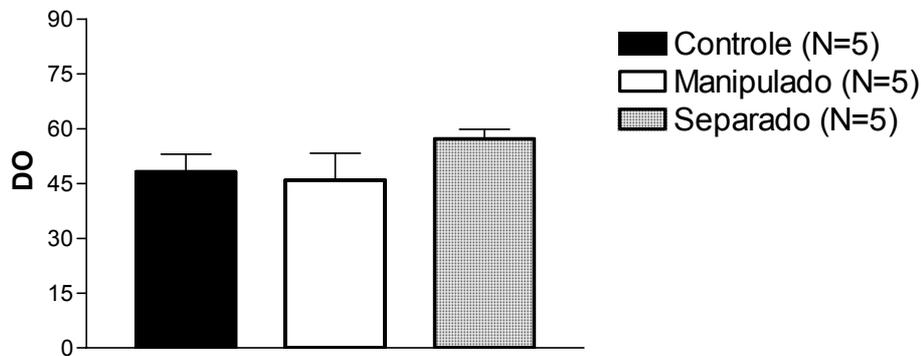


Figura 43: Densidade óptica na VTA dos grupos controle, manipulado e separado. Não houve diferença significativa ($p=0,13$) entre os grupos Controle ($49,0 \pm 2$), Manipulado ($53,6 \pm 3$) e Separado ($57,4 \pm 2$) pelo teste ANOVA ($F=2,40$).

Densidade Óptica (DO) Substância Nigra

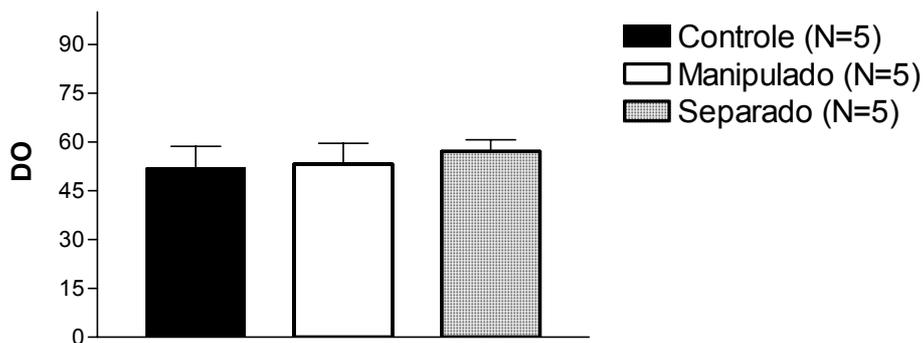


Figura 44: Densidade óptica na substância nigra dos grupos controle, manipulado e separado. Não houve diferença significativa ($p=0,80$) entre os grupos Controle ($51,9 \pm 6$), Manipulado ($53,1 \pm 6$) e Separado ($57,1 \pm 3$) pelo teste ANOVA ($F=0,22$).

4.3.2 Imagens Histológicas

Discussão



5 DISCUSSÃO

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar os efeitos do estresse neonatal sobre as respostas comportamentais tardias de medo, bem como sobre a imunomarcção da dopamina no complexo VTA-SN, região de projeção da dopamina do sistema mesocorticolímbico, importante modulador das respostas comportamentais de medo/ansiedade. Ratos machos foram submetidos do primeiro ao décimo dia de vida a dois tipos de intervenção: manipulação e separação materna. Quando adultos, estes animais foram comparados a animais controles em três experimentos, dois deles destinados para a avaliação da reatividade comportamental a estímulos estressores inatos ou aprendidos. O terceiro experimento consistiu de uma marcação imunoistoquímica de tirosina hidroxilase (TH) na VTA e na SNCo.

Primeiramente serão abordados os resultados advindos dos experimentos comportamentais, onde foram utilizados o teste do campo aberto na avaliação do medo inato e o condicionamento clássico ou pavloviano para a avaliação do medo aprendido. Em um segundo momento será tratado o resultado do experimento de Imunoistoquímica, que foi interpretado através da técnica de densitometria óptica, a fim de obter-se uma análise semi-quantitativa da quantidade de TH nas regiões estudadas.

5.1 Análise Comportamental

Nos experimentos comportamentais foram verificados os efeitos dos modelos de estresse neonatal por manipulação e separação materna sobre as respostas comportamentais de medo inato e aprendido. Os aspectos comportamentais indicativos de respostas de medo e/ou atividade exploratória foram registrados para comparação entre os três grupos: controles - ninhadas "intactas", sem nenhum tipo de intervenção por parte do experimentador; manipulados - retirados do ninho por 3 minutos com estimulação manual por 1 minuto; e separados - retirados do ninho por 180 minutos. Para interpretar os resultados, o grupo controle foi utilizado para comparação com ambos os grupos experimentais submetidos ao estresse neonatal.

5.1.1 Medo Aprendido

No experimento do condicionamento clássico, ou medo condicionado, foi observado que ratos manipulados no período neonatal manifestam, quando adultos, as seguintes alterações em relação aos controles e separados: 1) menor duração do comportamento de imobilização, 2) maior duração do comportamento de *rearing*, 3) menor latência para a extinção do condicionamento. Os animais submetidos à separação materna no período neonatal não apresentaram nenhuma diferença significativa em relação aos controles nos comportamentos analisados.

Os dados advindos do modelo de manipulação neonatal apontam para uma menor expressão de medo/ansiedade no que se refere às respostas de medo aprendido. Dentre todos os comportamentos analisados, a duração do comportamento de imobilização é, particularmente, um índice

importante e bastante confiável no que diz respeito à manifestação de medo destes animais. Os ratos submetidos à manipulação neonatal permaneceram significativamente menos tempo imóveis, e de acordo com outra análise deste dado, seu comportamento de imobilização foi, na sua maioria, simultâneo à emissão dos estímulos neutros ou condicionados na fase do teste. Este último dado leva a outra importante interpretação: os animais manipulados dispenderam menos tempo no comportamento de imobilização porque, de fato, expressam seu comportamento natural de resposta ao estresse de uma forma mais tênue, e não porque o processo de condicionamento não foi eficaz (o que também poderia explicar uma média de duração de imobilização pequena). O fato de estes animais emitirem o comportamento de imobilização exatamente no momento da percepção do estímulo condicionado confirma esta interpretação. Esta verificação da eficácia do processo de condicionamento foi observada da mesma forma nos demais grupos experimentais com mesmo resultado de alto índice de coincidências entre imobilização e estímulo neutro. Tal evidência pode levar a interpretação de que o processo de memória/aprendizagem de estímulos aversivos destes animais não está alterado, porém esta afirmativa ainda pode ser muita precipitada. Deve ser considerado que o índice de coincidências entre EC e imobilização não é um parâmetro tradicionalmente aceito para avaliação da habilidade de aprendizagens aversivas, estando o modelo de esquiva inibitória, ativa ou passiva muito mais relacionado com esta avaliação através das latências de fuga. Neste sentido, trabalhos anteriores já mostraram que animais manipulados apresentam uma performance superior a animais intactos quanto à aprendizagem de esquiva (LEVINE, et al., 1956; LEHMANN, et al., 2002). Entretanto, este índice deve ser interpretado de forma cautelosa, a similaridade entre animais controles, manipulados e separados na aprendizagem via condicionamento pode ser considerada neste trabalho como uma garantia de que alterações na intensidade das respostas, não se deve a comprometimentos na capacidade de aprendizagem, mas sim a uma real diferença na maneira e intensidade com que estes animais expressam o medo. Desta forma, o índice de coincidências entre EC e imobilização é útil no sentido de fornecer um controle experimental da variável “condicionamento”.

Além de permanecerem menos tempo imobilizados, os ratos manipulados apresentaram uma maior duração do comportamento de exploração do ambiente sobre as patas traseiras (*rearing*). Esta evidência fortalece a hipótese de que estes animais possuem sua resposta de medo condicionado atenuada, já que este comportamento pode ser indicativo de maior atividade exploratória, o que seria incompatível à resposta comportamental de medo e estresse na situação do teste. Estes resultados estão de acordo com os achados de Meerlo e colaboradores (1999), que também detectaram diminuição na duração de imobilização e aumento de *rearing* nos ratos manipulados no teste de medo condicionado, embora o modelo de condicionamento utilizado não seja exatamente o mesmo.

Outro dado importante obtido neste experimento foi a menor latência de extinção do condicionamento nos animais manipulados. Isto indica que estes animais não só têm a expressão dos comportamentos de estresse atenuados como também desassocia mais rapidamente o estímulo neutro do estímulo incondicionado, o que também pode ser entendido como uma aprendizagem mais rápida de que o estímulo neutro não serve mais como alarme para uma situação ou estímulo aversivos. Cabe salientar que a menor latência de extinção do condicionamento do medo não está necessariamente relacionada com a resposta de medo atenuado observada nos animais manipulados. Embora sejam raros trabalhos que utilizam este índice para a avaliação das respostas de medo condicionado, Morrow e colaboradores (1999) relataram que mecanismos fisiológicos independentes modulam os parâmetros comportamentais de imobilização e extinção do condicionamento. Sendo assim, a extinção acelerada de uma aprendizagem aversiva observada em animais manipulados pode ser considerada mais uma evidência dos efeitos tardios deste tipo de intervenção, podendo levar a especulações quanto a sua repercussão clínica, uma vez que a incapacidade de extinguir aprendizagens aversivas pode ser diretamente relacionada a patologias psiquiátricas, como por exemplo, o Transtorno de Estresse Pós-Traumático em humanos.

Em um recente estudo utilizando o modelo sobressalto (*startle*) acústico em ratos Long-Evans, Kalinichev e colaboradores (2002) não

observaram diferenças entre ratos machos, controles e manipulados por 15 minutos. Neste mesmo trabalho, os autores detectaram que animais submetidos à separação materna de 3 horas nas três primeiras semanas de vida apresentam maior resposta de *startle* separação em relação aos manipulados e não-manipulados. Muito embora estes resultados pareçam contraditórios com os resultados desta pesquisa, deve-se levar em consideração diferenças nos modelos de avaliação de medo e de organização das ninhadas. Neste trabalho houve uma redistribuição dos filhotes formando ninhadas inteiramente de machos ou de fêmeas, variável que é sabidamente importante para a avaliação de diferentes parâmetros comportamentais na vida adulta. Outro fato a se considerar é quanto ao modelo de *startle*, no qual é avaliada a resposta imediata a um estressor médio (som alto) real, enquanto no paradigma de medo condicionado, usado neste trabalho, avaliou-se a resposta da expectativa de ser (novamente) submetido a um estressor, sendo, portanto, considerado um modelo de estresse psicológico (FINK, 2000). A discordância nos dados deste trabalho é um exemplo de quão complexa é a avaliação das conseqüências comportamentais tardias das intervenções precoces, visto que devem ser consideradas todas as variáveis que podem estar interferindo nos diferentes aspectos do desenvolvimento do animal.

De uma forma geral, os resultados obtidos neste experimento levam a conclusão de que a manipulação, mas não a separação, realizada no período hiporresponsivo, leva a alterações na expressão do medo, causando uma menor reatividade frente a estressores psicológicos, bem como a uma extinção mais rápida do condicionamento do medo em ratos machos adultos.

5.1.2 Medo Inato

No experimento de campo aberto, foi possível confirmar os dados já conhecidos em relação ao aumento da atividade exploratória em

ambientes novos dos animais manipulados no período neonatal, (LUCION et al., 2001; DENELSKY e DENENBERG, 1964; LEVINE et al., 1967). Resumidamente, os resultados referentes ao modelo de manipulação neonatal foram os seguintes: 1) maior duração de locomoção, 2) menor frequência de locomoção, 3) maior duração e frequência do comportamento *rearing*, 4) menor duração de autolimpeza 5) maior frequência de entrada nos quadrantes centrais do campo. Novamente os dados obtidos apontam na direção de uma menor inibição comportamental dos animais manipulados em relação aos controles. Este resultado também permite uma confirmação de que o modelo de manipulação utilizado seguiu os padrões de outras pesquisas que investigaram os efeitos deste tipo de intervenção. Quanto aos efeitos tardios da separação materna, não foram observadas alterações significativas no comportamento destes animais quando comparados aos controles, exceto pelo fato destes animais apresentarem uma menor frequência de locomoção. Considerando-se que os animais submetidos à separação materna apresentam uma duração de locomoção semelhante à dos controles, pode-se concluir que estes animais realizam menos paradas ao se locomover na exploração do ambiente, não significando desta forma, que esta diminuição da frequência de locomoção esteja relacionada com uma diminuição da atividade exploratória. A título de especulação, este dado pode até mesmo ser entendido como uma diminuição da inibição comportamental, já que uma menor frequência de locomoção gerada por uma média menor de paradas, pode indicar menor hesitação ao explorar o novo ambiente.

Recentemente, Meaney e colaboradores (2002) relataram dados que corroboram os resultados aqui observados. No teste de campo aberto, animais manipulados manifestaram uma maior atividade locomotora nos primeiros 5 minutos de permanência, enquanto que neste tempo de avaliação, animais separados e controles não diferiram entre si. Já em permanências maiores no campo, animais separados e controles aumentam sua atividade exploratória, sendo os animais controles ainda mais ativos que os separados. Em 20 minutos de permanência no campo aberto, separados e controles mostram-se mais ativos que animais manipulados. Estes dados confirmam o aspecto de menor expressão de medo dos animais manipulados,

já que manifestam atividade exploratória aumentada somente nos primeiros momentos de avaliação, quando o campo é interpretado como um ambiente novo, capaz de gerar respostas de inibição comportamental instintiva em roedores. Esta evidência reforça a hipótese de que a maior locomoção observada nestes animais pode ser interpretada como sendo uma alteração no âmbito da reatividade emocional, e não unicamente uma alteração motora.

Estudos abordando os efeitos neurofisiológicos da separação materna estão gradualmente convergindo para um mesmo ponto: esta intervenção parece causar alterações nos sistemas responsivos ao estresse no sentido de um aumento de sua reatividade (KALINICHEV et al., 2002; FRANCIS, 1999; PLOTSKY e MEANEY, 1993; LIU et al., 1999), o que levaria, a princípio, a respostas comportamentais indicativas de maior medo/ansiedade. Contudo, os resultados reportados na literatura quanto às respostas comportamentais destes animais em situações aversivas não são concordantes. Quanto ao teste de campo aberto, o que se observa são resultados comportamentais altamente contraditórios, uma vez que, com protocolos praticamente idênticos de separação, vê-se o aumento na resposta de medo inato através da diminuição da exploração (OGAWA et al., 1994; WIGGER e NEWMANN, 1999); a diminuição da resposta de medo com maior exploração de ambiente novo (VON HOERSTEN, 1993) bem como a ausência de efeitos desta intervenção (MEANEY et al., 2002; SHALEV e KAFKAFI, 2002). A discordância nestes resultados se deve, em boa parte, a falta de um padrão no que se refere ao grupo controle utilizado pelos diferentes laboratórios, bem como a nuances nos modelos de separação utilizados.

Os resultados aqui encontrados estão de acordo com os trabalhos recente de Shalev e Kafkafi (2002) e Meaney e colaboradores (2002) que, ao compararem manipulados, controles e separados, verificaram as mesmas diferenças aqui observadas entre manipulados e controles bem como a ausência de efeito da separação em relação aos controles quanto ao comportamento no campo aberto com 5 minutos de permanência. Deve-se salientar o fato de que nestes trabalhos, tanto o modelo de intervenção, quanto à comparação de ambos os grupos experimentais (manipulados e separados)

com o controle seguiram os padrões utilizados nesta pesquisa, ao contrário da maioria dos demais trabalhos encontrados na literatura e aqui citados. Este dado reforça o achado de que, embora a separação materna seja aparentemente uma intervenção, de certa forma, mais violenta, ela não é capaz de gerar efeitos em longo prazo na reatividade a um ambiente novo nos indivíduos, sendo a manipulação de 3 minutos mais eficaz em gerar tais alterações.

5.1.3 Análise Geral do Comportamento

Juntos, os dados advindos da análise comportamental apontam para uma mesma direção: animais submetidos à manipulação de 3 minutos no período hiporresponsivo apresentam uma menor inibição comportamental, tanto em resposta a uma aprendizagem aversiva quanto frente a um estressor natural (ambiente novo); e animais submetidos à separação materna de 180 minutos neste mesmo período não apresentam alterações nas respostas de medo quando comparados aos controles. Tais resultados levam a uma conclusão, de certa forma, paradoxal, visto que uma intervenção branda como a manipulação, teria conseqüências mais duradouras e/ou evidentes que um estresse crônico, como é considerada a separação materna (KUHN e SCHANBERG, 1998).

Em uma tentativa de entender os resultados encontrados, pode-se recorrer a alguns estudos (LIU et al., 1997; CALDJI et al., 2000; 1998; TODESCHINI, 2002) que avaliaram o comportamento de ratos que tiveram como mães, fêmeas com maior ou menor expressão de comportamento maternal, traduzido por altos ou baixos índices de *licking* e *groomng* (lamber e limpar seus filhotes), respectivamente. Estes estudos mostram que animais com mães mais “cuidadas” teriam, tanto neuroendócrina quanto comportamentalmente, respostas muito semelhantes às encontradas em

animais submetidos à manipulação neonatal, enquanto os filhotes de mães pouco “cuidadas” apresentariam quando adultos, respostas apenas neuroendócrinas semelhantes àqueles submetidos à separação materna. Tais resultados levam à hipótese de que a variável real com que se está lidando em estudos de intervenção precoce, seria o comportamento maternal, e não a intervenção do experimentador em si. Assim, períodos pequenos de separação gerariam um aumento no cuidado materno (WOODSIDE apud KAUFMAN et al., 2000; CALDJI et al., 1998; TODESCHINI, 2002), e a separação prolongada geraria a falta deste cuidado (KAUFMAN et al., 2000). Todavia, experimentos prévios de nosso laboratório (TODESCHINI, 2002), mostraram que tanto a manipulação (de 3 minutos), quanto à separação (de 180 minutos) levaram ao aumento da duração do comportamento da mãe de lambe os filhotes.

Considerando que na presente pesquisa, somente os animais manipulados apresentaram alterações comportamentais tardias, pode-se inferir que a resposta da mãe, de aumentar seu cuidado com os filhotes afastados do ninho por períodos prolongados, cause no filhote uma compensação desta intervenção, conseguindo, de certa forma, reverter os efeitos comportamentais do estresse da separação prolongada, fazendo com que os filhotes apresentem respostas comportamentais semelhantes às dos animais do grupo controle. Já a mãe dos filhotes que saíram do ninho por períodos curtos, como ocorre na manipulação, conseguiria, através da alteração de seu comportamento, mais que apenas compensar o efeito da própria intervenção, mas também gerar um novo efeito, uma extrapolação da compensação do estresse causado pela manipulação, submetendo seus filhotes a um padrão de cuidado materno “excessivo”, que causaria os efeitos relatados da manipulação neonatal. Tal interpretação ainda permanece uma especulação, visto que ainda não haja dados suficientes que confirmem esta hipótese.

Outras considerações devem ser feitas a respeito da aparente discrepância dos efeitos da separação materna entre os resultados desta pesquisa e os resultados encontrados na literatura. Primeiramente deve-se atentar para o fato de que em muitos grupos de pesquisa que estudam modelos de estresse neonatal, são utilizados ratos de diferentes linhagens,

como Long-Evans ou Sprague-Dawley, enquanto nesta pesquisa foram utilizados ratos da variedade Wistar. Sabe-se que o comportamento materno pode variar entre as linhagens, desta forma, é possível assumir que este é um fator potencialmente capaz de gerar efeitos distintos neste modelo de intervenção. Outro ponto importante a ser colocado é quanto ao próprio método de comparação entre os grupos experimentais. Muitos trabalhos (MEANEY et al., 2002; LIU et al., 2000), que apontam alterações comportamentais causadas pela separação materna consideram como controles, ratos submetidos à intervenção por manipulação, ou mesmo animais que foram submetidos a “rotina normal do biotério”, que muitas vezes implica em um certo grau de intervenção, já que as caixas moradia são trocadas regularmente no biotério, e nesse processo pode existir um certo grau de manipulação dos filhotes. Tendo em vista esse fato, é possível que os trabalhos que avaliam os efeitos comportamentais da separação não sejam de todo contraditórios, já que na verdade, a comparação que está sendo feita é entre separados e manipulados, e as diferenças entre estes dois grupos é inquestionavelmente robusta e evidente.

5.2 Análise Imunoistoquímica

A técnica Imunoistoquímica foi utilizada para verificar possíveis efeitos do estresse neonatal sobre a intensidade de marcação na dopamina do sistema mesocorticolímbico. Não foram detectadas diferenças significativas quanto à intensidade de marcação da tirosina hidroxilase, enzima precursora da dopamina, na VTA e parte compacta da substância nigra, entre os grupos controle, manipulado e separado. Embora animais manipulados apresentem alterações na responsividade ao estresse tanto em um nível comportamental quanto neuroendócrino, este modelo de intervenção precoce não afetou as regiões de projeção do sistema dopaminérgico mesencefálico, que poderiam

estar contribuindo, juntamente com as já bem retratadas alterações do eixo HPA, com as alterações comportamentais observadas. Porém deve-se considerar que diversos trabalhos (ANDERSEN et al., 1999; PAPAIOANNOU et al., 2002; LIU et al., 2000) mostraram alterações nas concentrações de monoaminas em diversas áreas relacionadas às respostas de medo em animais submetidos a diferentes modelos de intervenção no ambiente neonatal. Por outro lado, alterações em regiões específicas nas vias mesocorticais parecem gerar respostas comportamentais semelhantes às observadas em animais manipulados, como se vê no trabalho de Morrow e colaboradores (1999) no qual relataram que lesões em neurônios dopaminérgicos mesoprefrontais alteram a extinção da aprendizagem do medo, não interferindo na aquisição deste condicionamento, resultado que coincide com o padrão de respostas apresentadas pelos animais manipulados nesta pesquisa. Desta forma, a hipótese de que existem mudanças no sistema dopaminérgico mesocorticolímbico que podem estar atuando, conjuntamente com o eixo HPA na modulação das respostas de estresse observadas em animais manipulados não pode ser descartada.

Assim como na manipulação neonatal, o modelo de separação materna também não levou a alterações na densidade de dopamina nos núcleos de projeção mesencefálicos. Estes resultados concordam com os dados de Andersen e colaboradores (1999), onde também não foram observadas alterações no número de células marcadas positivamente para tirosina hidroxilase na VTA e na SN, embora neste trabalho tenha sido usado um modelo separação de 4 horas dos dias 2 a 20 após o nascimento. Em outro trabalho, realizado por Braum e colaboradores (2000), também não foram observadas diferenças no número de corpos neuronais dopaminérgicos na VTA e SN entre animais separados por uma hora nas primeiras três semanas de vida e controles, reforçando os achados da presente pesquisa quanto aos efeitos deste modelo de intervenção. Contudo, estes pesquisadores detectaram uma diminuição na densidade de inervações dopaminérgicas nos córtices cingulado anterior, medial e pré-central e no córtex pré-frontal de animais submetidos a este modelo de separação, o que fortifica a hipótese de que de fato existem alterações da dopamina mesencefálica, particularmente do

sistema mesocortical, em animais submetidos a esta intervenção precoce. Os autores levantam a hipótese de que a diminuição da densidade das fibras dopaminérgicas seria consequência de uma supressão do processo de arborização axonal nestes animais. Esta evidência está de acordo com a hipótese de que a dopamina do sistema mesolímbico atuaria inibindo a resposta de estresse através da amígdala (INGLIS e MOGHADDAM, 1999). Gariépy e colaboradores (2002) observaram que animais manipulados apresentaram quando adultos uma maior concentração de receptores D_1 no núcleo *accumbens* (Nacc), importante estrutura na modulação de respostas emocionais. Por outro lado, Meaney e colaboradores (2002) não detectaram tais alterações, reportando que animais manipulados, separados e controles apresentam a mesma concentração de receptores D_1 e D_2 em regiões efectoras dos sistemas dopaminérgicos mesocortical e mesolímbico (córtex pré-frontal e Nacc). Todavia estes autores mostraram uma diminuição nos níveis de transportador de dopamina no Nacc de animais separados em relação a manipulados e controles. Estes autores também encontraram aumento da dopamina no Nacc em resposta a estresse por pressão da cauda em animais separados.

Tomados em conjunto, estes resultados levam a diversas conclusões. Primeiramente, é marcante a discordância no que se refere ao papel específico da dopamina nas respostas de medo. Duas correntes exploram este aspecto, uma supondo um papel inibitório, através do sistema mesolímbico atuando em receptores D_1 e D_2 na amígdala; e outra levanta a questão da interação da dopamina com o eixo HPA, defendendo uma interação direta deste neurotransmissor com a liberação de corticosterona, possuindo, portanto, um papel excitatório no que se refere à resposta ao estresse.

Observa-se também que as alterações dopaminérgicas consequentes de interferências no ambiente precoce dos animais são geralmente nas regiões efectoras das projeções do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, e não nas áreas de projeção como na VTA e SN. Embora também não tenham sido detectados efeitos da manipulação sobre o número de células dopaminérgicas nos núcleos hipotalâmicos paraventricular,

arqueado e periventricular, regiões efetoras do sistema dopaminérgico túbero-infundibular (HERMEL et al., 2001).

Outro ponto importante é o fato de que as alterações causadas pelo estresse precoce são geralmente observadas em resposta a uma situação aversiva, e dificilmente atuam nos sistemas em níveis basais. Esta constatação leva a suposição de que, salvo a exceção de algumas regiões específicas, como no núcleo paraventricular do hipotálamo (trabalho ainda em andamento em nosso laboratório), por exemplo, onde observam-se alterações morfológicas, as conseqüências a longo prazo de intervenções precoces como a manipulação e separação estariam atuando em um nível funcional, e não estrutural.

Outra maneira de entender o resultado obtido é considerar a hipótese de que a dopamina mesencefálica estaria realmente inalterada em animais submetidos a intervenções precoces. Esta suposição pode ser levantada a partir do pressuposto de que a dopamina não estaria envolvida com a resposta ao estresse em si, mas sim com um mecanismo único que se ativa frente a qualquer estímulo que provoca reações comportamentais. Para Stanford e Zigmond (2000) o fato de haver aumento da ativação de dopamina tanto na resposta a um estressor agudo, quanto em resposta a exposição de drogas de abuso, atividade sexual e alimentação, leva a conclusão de que qualquer estímulo que provoca um comportamento leva ao aumento de dopamina, destacando a importância da dopamina para processos como atenção e sobrevivência. Neste caso, as alterações de dopamina não estariam relacionadas com uma maior ou menor resposta ao estresse, mas sim com a própria resposta. Não atuando no sentido de estimular ou inibir esta resposta. Seguindo esta hipótese, ao considerar que a dopamina, assim como as demais catecolaminas estão relacionadas com as estratégias de enfrentamento de estímulos estressores (MEERLO, et al.,1999), pode-se esperar que realmente animais manipulados não apresentem alterações no sistema dopaminérgico mesencefálico, já que estes animais, embora tenham a resposta de medo atenuada, não se diferenciam quanto suas estratégias de enfrentar o agente estressor (MEERLO, et al.,1999). Contudo tais colocações ainda são

especulações, visto que os trabalhos levados a cabo até então ainda não esclareceram totalmente se de fato o sistema dopaminérgico é suscetível a intervenções precoces no ambiente do indivíduo.

Finalmente, cabe aqui salientar a importância de que mais pesquisas sejam levadas no sentido de esclarecer os mecanismos biológicos que regem as alterações comportamentais observadas nestes modelos de intervenção, assim como definir mais precisamente o âmbito destes efeitos, como é o caso da separação materna. Sabe-se que experiências adversas precoces na família, como abuso, negligência emocional, punições inconsistentes são fatores de risco para uma grande quantidade de distúrbios mentais, incluindo depressão, transtornos de ansiedade e abuso de substâncias. Em roedores, os modelos de manipulação e separação materna parecem mimetizar as alterações tanto comportamentais quanto fisiológicas encontradas nestas patologias. Os resultados desta pesquisa podem contribuir para fundamentar os componentes comportamentais e biológicos destas experiências. Mesmo não passando de uma especulação, a correlação entre os efeitos encontrados nestes modelos animais de intervenção e as evidências de que crianças submetidas a maus tratos ou abuso na infância estão mais propensas à exposição a estímulos adversos, como o uso de substâncias, bem como o fato de que crianças que sofreram abandono são comprovadamente mais vulneráveis a distúrbios de ansiedade, não pode ser ignorada, mostrando a relevância destes estudos.

Desta forma, o conhecimento detalhado dos sistemas neurais e padrões comportamentais que subjazem estas intervenções são de grande importância clínica, tanto no sentido de procurar por intervenções que revertam os efeitos negativos a longo prazo destas experiências, quanto na atuação em um nível preventivo, a partir da detecção das vulnerabilidades individuais.

Conclusões



6 CONCLUSÕES

1) A manipulação neonatal de três minutos, realizada nos primeiros dez dias de vida, levou a uma menor inibição comportamental nos paradigmas de medo inato e aprendido de ratos machos adultos.

2) Animais manipulados no período neonatal além de expressarem de forma mais tênue as respostas de medo aprendido, também extinguem mais rapidamente esta aprendizagem aversiva.

3) As intervenções estudadas não afetaram a capacidade de aprendizagem via condicionamento clássico dos animais.

4) A separação materna de 180 minutos, realizada nos primeiros dez dias de vida, não levou a alterações comportamentais em nenhum dos paradigmas de medo estudados.

5) Nenhum dos modelos de intervenção neonatal estudados levaram a alterações tardias na intensidade de marcação da tirosina hidroxilase na VTA e SNC.

Referências Bibliográficas



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, B. W.; MOGHADDAM, B. Tactile stimulation activates dopamine release in the lateral septum. *Brain Research*. v.858, n.1, p.177-180, 2000.
- AGUIAR, C. E.; CADORE, L. P.; PADOIN, M. J.; BARBOSA-COUTINHO, L. M. Aversive stimulation during the stress-hyporesponsive period does not affect the number of corticotroph cells in neonatal male rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.30, p.1463-66, 1997.
- ANAND K. J. S.; SCALZO, F. M. Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? *Biology of the Neonate Review*. v.77 p.69-82, 2000.
- ANDERSEN, S. L.; LYSS, P. J.; DUMONT, N. L. *et al.* Enduring neurochemical effects of early maternal separation on limbic structures. *Annals of New York Academy Sciences*. v.877, p.756-59, 1999.
- ANGULO, J. A.; PRINTZ, D.; LEDOUX, M.; *et al.* Isolation stress increases tyrosine hidroxilase m RNA in the locus coeruleus and midbrain and decreases proenkephalin m-RNA in the striatum and nucleus accumbens. *Molecular Brain Research*. v.11, p.301-08, 1991.
- ANISMAN, H.; KELLY, O.; HAYLEY, S.; *et al.* Acoustic startle and fear-potentiated startle in rats selectively bred for fast and slow kindling rates: relation to monoamine activity. *European Journal of Neuroscience*. v.12, p.4405-16, 2000.
- _____. ZAHARIA, M. D.; MEANEY, M. J.; *et al.* Do early life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *International Journal of Development Neuroscience*. v.16, p.149-64, 1998.
- AVANZI, V.; BRANDÃO, M. L. Activation of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. *Behavioural Brain Research*. n.126, p.175-84, 2001.

- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- BECK, C. H. M.; FIBIGER, H. C. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. *The Journal of Neuroscience*. v.15, n.1, p.709-20, 1995.
- BERTLER, A.; ROSENGREN, E. Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia*. v.15, n.1, p.10-11, 1959.
- BOCCIA, M. L.; PEDERSEN, C. A. Brief vs. long maternal separations in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior and lactation levels of aggression and anxiety. *Psychoendocrinology*. v.26, p.657-72, 2001.
- BOROWSKI, T. B.; KOKKINIDIS, L.; Contribution of ventral tegmental area dopamine neurons to expression of conditioned fear: effects of electrical stimulation, excitotoxic lesions and quinpirole infusion on potentiated startle in rats. *Behavioral Neuroscience*. v.110, p.1349-64, 1996.
- BLASCHKO, H. Metabolism and storage of biogenic amines. *Experientia*, v.13, p.9-12, 1957.
- BLOOM, F. E. *Neurotransmissão e o sistema nervoso central*. In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E. (eds). *Goodman e Gilman: Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996.
- BUIJS, R. M.; GEFFARD, M.; POOL, C. W.; HOORNEMAN, E. M. D. The dopaminergic innervation of the supraoptic and paraventricular nucleus. A light and electron microscopical study. *Brain Research*. v.323, p.65-72, 1984.
- CALDJI, C.; TANNENBAUM, B.; SHARMA, S.; FRANCIS, D.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M.J. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.95, n.9, p.5335-40, 1998a.
- _____. DIORIO, J.; MEANEY, M. J. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biology Psychiatry*. v.48, p.1164-74, 2000b.
- _____. FRANCIS, D.; SHARMA, S.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. The effects of early rearing environment on the development of GABA_A and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology*. v.22, n.3, p. 219-229, 2000c.
- CARLSSON, A.; FALCK, B.; HILLARP, N. A. Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiologica scandinavica*, v.56, p.1-28, 1962.
- CASOLINI, P.; PIAZZA, P. V.; KABBAJ, M; *et al.* The mesolimbic dopaminergic system exerts an inhibitory influence on brain corticosteroid receptor affinities. *Neuroscience*. v.55, n.2, p.429-34, 1993.
- CHAMPAGNE, F. MEANEY, M. J. Like mother, like daughter: evidence for non-

- genomic transmission of parental behavior and stress responsivity. *Prog Brain Research*. v.133, p.287-302, 2001.
- COCO, M. L.; KHUN, C. M. ELY, T. D.; *et al.* Selective activation of mesoamygdaloid dopamine neurons by conditioned stress: attenuation by diazepam. *Brain Research*. v.590, p.39-47, 1992.
- COOPER, J. R.; BLOOM, F. E.; ROTH, R. H. *The biochemical basis of neuropharmacology*. New York: Oxford University Press, 1991.
- COSTELA, C.; TEJEDOR-REAL, P.; MICO, J. A.; GILBERT-RAHOLA, J. Effect of neonatal handling on learned helplessness model of depression. *Physiology and Behavior*. v.57, p.407-10, 1995.
- COYLE, J. T.; HENRY, D. Catecholamines in fetal and newborn rat brain. *Journal of Neurochemistry*. v.21, p.61-7, 1973.
- DALLMAN, M. F. Editorial: Moments in time - the neonatal rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*. v.141, n.5, p.1590-92, 2000.
- DENENBERG, V. H. Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity: a theory of infantile stimulation. *Psychological Review*. v.71, n.5, p.335-51, 1964.
- DENT, G.W.; SMITH, M. A.; LEVINE, S. Rapid induction of corticotropin-releasing hormone gene transcription in the paraventricular nucleus of the developing rat. *Endocrinology*. v.141, p.1593-98, 2000.
- DEUTCH, A. Y.; LEE, M. C.; GILLHAM, M. H.; *et al.* Stress selectively increases fos protein in dopamine neurons innervating the prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*. v.1, p.273-92, 1991.
- _____. TAM, S. Y.; ROTH, R. H. Footshock and conditioned stress increase 3,4 dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the ventral tegmental area but not in substantia nigra. *Brain Research*. v.333, p.143-46, 1985.
- EATON, M. J.; WAGNER, C. K.; MOORE, K. E.; LOOKINGLAND, K. J. Neurochemical identification of A13 dopaminergic neuronal projections from the medial zona incerta to the horizontal limb of the diagonal band of Broca and the central nucleus of the amygdala. *Brain Research*. v.659, p.201-07, 1994.
- ENRICO, P.; BOUMA, M.; VRIES, J.; WESTERINK, B. The role of afferents to the ventral tegmental area in the handling stress-induced increase in the release of dopamine in the medial prefrontal cortex: a dual-probe microdialysis study in the rat brain. *Brain Research*. v.779, p.205-13, 1998.
- FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; GIMÉNEZ-LLORT, L.; ESCORIHUELA, R.; *et al.* Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. v.73, p.233-45, 2002.
- FINK, G. *Encyclopedia of Stress*. San Diego: Academic Press, 2000.
- FOSSATI, I. A.. Interação entre Hormônios Esteróides Gonadais e Manipulação Neonatal sobre o Comportamento de Ratos. 2002. 147f. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Porto Alegre.

- FRANCIS, D. D., CALDJI, C., CHAMPAGNE, F., PLOTSKY, P. M., MEANEY, M. J. The role of corticotropin-releasing factor-norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavior and endocrine responses to stress. *Biology Psychiatry*. v.46, p.1153-66, 1999.
- _____. CHAMPAGNE, F. A.; LIU, D.; MEANEY, M. J. Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. *Ann. NY Ac. Sci.* v.896, p.66-84, 1999.
- FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. *Acta Physiologica Scandinavica*, v.64, p.37-84, 1965.
- GARIÈPY, J. L. RODRIGUIZ, R. M. JONES, B. C. Handling, genetic and housing effects on the mouse stress system, dopamine function, and behavior. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. v.73, p.7-17, 2002.
- GILAD, V. H.; RABEY, J. M.; ELIYAYEV, Y., *et al.* Different effects of acute neonatal stressors and long-term postnatal handling on stress-induced changes in behavior and in ornithine decarboxylase activity of adult rats. *Developmental Brain Research*. v.120, p.255-59, 2000.
- GOMES, C. M, FRANTZ, P. J., SANVITTO, G. L, FRANCI, A. J. A., LUCION, A. B. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.32, p.1239-42, 1999.
- GOULD, E. The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.743, p.73-93, 1994.
- GOLDSTEIN, L. E.; RASMUSSEN, A. M. BUNNEY, B. S.; ROTH, R. H. Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *The Journal of Neuroscience*. v.16, n.16, p.4787-98, 1996.
- GRAY, J. A. *The Psychology of Fear and Stress*. 2ed., Cambridge: Cambridge Press, 1991.
- GREBA, Q.; MUNRO, L. J.; KOKKINIDIS, L. The involvement of ventral tegmental area cholinergic muscarinic receptors in classically conditioned fear expression as measured with fear-potentiated startle. *Brain Research*. v.870, p.135-41, 2000.
- GUARRACI, F. A.; FROHARDT, R. J.; KAPP, B. S. Amygdaloid D₁ dopamine receptor involvement in pavloviano fear conditioning. *Brain Research*. v.827, p.28-40, 1999.
- _____. KAPP, B. S. An electrophysiological characterization of ventral tegmental area dopaminergic neurons during differential pavloviano fear conditioning in the awake rabbit. *Behavioural Brain Research*. v.99, p.169-79, 1999.
- GUILLAMÓN, A.; BLAS, M. R.; SEGOVIA, S. Effects of sex steroids on the

- development of the locus coeruleus in the rat. *Developmental Brain Research*. v.40, p.306-310, 1988.
- HAGAN, R. M.; JONES, B. J.; JORDAN, C. C.; TYERS, M. B. Effect of 5-HT₃ receptor antagonist on responses to selective activation of mesolimbic dopaminergic pathways in the rat. *Brazilian Journal Pharmacology*. v.99, p.227-32, 1990.
- HALL, F. S. Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Crit. Rev. Neurobiol.* v.12, n.1-2, p.129-62, 1998.
- HENNING, S. J. Plasma concentration of total and free corticosterone during development in the rat. *American Journal of Physiology*. v.235, p.451-56, 1978.
- HERMEL, E. E. S.; SEVERINO, G. S.; CECCONELLO, A. L.; *et al.* Neonatal handling and the expression of immunoreactivity to tyrosine hydroxylase in the hypothalamus of adult male rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.34, n.9, p.1191-95, 2001.
- HORNYKIEWICZ, O. Dopamine (3-hidroxytyramine) and brain function. *Pharmacological Reviews*. v.18, n.2, p.925-64, 1966.
- INGLIS, F. M.; MOGHADDAM, B. Dopaminergic innervation of the amygdala is highly responsive to stress. *Journal of Neurochemistry*. v.72, n.3, p.1088-94, 1999.
- IVERSEN, L. IVERSEN, S. SNYDER, S. *Handbook of Psychopharmacology chemical pathways in the brain*, New York: Plenum Press, 1978.
- IWASAKI, S.; INOUE, K.; HIKJI, K. Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life. *Physiology e Behavior*. v.70. p.551-56, 2000.
- KALINICHEV, M.; EASTERLING, K. W.; HOLTZMAN, S. G. Early neonatal experience of long-evans rats results in long-lasting changes in reactivity to a novel environment and morphine-induced sensitization and tolerance. *Neuropsychopharmacology*. v.27, n.4, p.518-33, 2002.
- _____. EASTERLING, K. W.; PLOTSKY, P. M.; *et al.* Long-lasting changes in stress-induced corticosteron response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. v.73, p.131-40, 2002.
- KAMPHUIS, P.J.; BAKKER, J. M.; BROEKHOVEN, M. H.; *et al.* Enhanced glucocorticoid *feedback* inhibition of hypothalamo-pituitary-adrenal responses to stress in adult rats neonatally treated with dexamethasone. *Neuroendocrinology*, v.76, n.3, p.158-69, 2002.
- KAUFMAN, J.; PLOTSKY, P. M.; NEMEROFF, C. B.; CHARNEY, D. S. Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. *Biological Psychiatry*. v.48, n.8, p.778-90, 2000.
- KEHOE, P.; SHOEMAKER, WJ.; TRIANO, L.; CALLAHAN, M.; RAPPOLT, G. Adult rats stressed as neonates show exaggerated behavioral responses to both pharmacological and environmental challenges. *Behavioral Neuroscience*, v.112, n.1, p.116-25, 1998.

- KHUN, C. M.; BULER, S.R.; SCHANBERG, S. M. Selective depression of serum growth hormone during maternal deprivation in rat pups. *Science*.v.201, p.1034-201, 1978.
- _____. PAUK, J.; SCHANBERG, S. M. Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Development Psychobiology*. v.23, p.395-410, 1990.
- _____. SCHANBERG, S. M. Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *Int. J. Devl. Neuroscience*. v.16, n.3/4, p.261-70, 1998.
- KONIGSMARK, B. W. Methods for the counting of neurons. In: *Contemporary Research methods in neuroanatomy*. New York: Springer-Verlag, 1970.
- KVETNANSKY, R.; PACÁK, K.; SABBAN, EL.; KOPEN, IJ.; GOLDSTEIN, DS. Stressor specificity of peripheral catecholaminergic activation. *Advances in Pharmacology*. v.42, p.552-56, 1998.
- LADD, C. O. HUOT, R. L. THRIVIKRAMAN, K. V ;*et al.* Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Progress in brain research: The biological basis for mind body interactions*. v.122. Amsterdam: Elsevier, p.79-101.1998.
- LAMONT, E. W., KOKKINIDIS, L. Infusion of the dopamine D₁ antagonist SCH23390 into the amygdala blocks fear expression in a potentiated startle paradigm. *Brain Research*. v.795, p.128-136, 1998.
- LE MOAL M.; SIMON, H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *The American Physiological Society*. v.71, n.1, p.155-233, 1991.
- LEE, M.; WILLIAMS, D. Changes in liking behavior of rat mother following handling of young. *Animal Behavior*. v.22, p.679-81, 1974.
- LE DOUX, J. *O Cérebro Emocional: os misteriosos alicerces da vida emocional*. 2ed., Rio de Janeiro: Objetiva, 1998.
- LEFKOWITZ, R.J.; HOFFMAN, B.B.; TAYLOR, P. Neurotransmissão: os sistemas nervosos autônomo e motor somático. In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E. (eds). *Goodman e Gilman: Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw Hill, p. 77-102, 1996.
- LEHMANN, J.; PRYCE, C. R.; BETTSCHEN, D.; *et al.* The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. v.64, n.4, p.705-15, 1999.
- _____. STÖHR, T.; SCHULLER, J.; *et al.* Long-term effects of repeated maternal separation on three different latent inhibition paradigms. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. v.59, n.4, p.873-82, 1998.
- _____. WEIZMAN, R.; LESCHINER, S., *et al.* Peripheral benzodiazepine receptors reflect trait (early handling) but not state (avoidance learning). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. v.73, p.87-93, 2002.
- LEVINE, S. Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science* v.135, p.795-99, 1962.

- _____. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.746, p.275-93, 1994.
- _____.; HUCHTON, D. M.; WIENER, S. G., *et al.* Time course of the effect of maternal deprivation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Development Psychobiology*. v.24, p.547-58, 1991.
- _____. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology and Behavior*. v.73, p.255-60, 2001.
- _____. HUCHTON, D.M.; WIENER, S.G.; ROSENFELD, P. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant. *Development Psychobiology*. v.24, p.547-58, 1991.
- LEVITA, L.; DALLEY, J. W.; ROBBINS, T. W. Nucleus accumbens dopamine and learned fear revisited: a review and some new findings. *Behavioural Brain Research*. v.137, p.115-27, 2002.
- LIU, D.; CALDJI, C.; SHARMA, S.; PLOTSKY, P. M. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*. v.12, p.5-12, 2000.
- _____. CALDJI, C.; SHARMA, S.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. The effects of early life events on in vivo release of norepinephrine in the paraventricular nucleus of hypothalamus and hypothalamic-pituitary-adrenal responses during stress. *Journal of Neuroendocrinology*. no prelo.
- _____. DIORIO, J.; TANNENBAUM, B. CALDJI, C.; *et al.* Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. v.277, p.1659-62, 1997.
- _____. TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.; *et al.* Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. v.277, p.1659-62, 1997.
- LONSTEIN, J. S.; WAGNER, C. K.; VRIES, G. J. Comparison of the nursing and other parental behaviors of nulliparous and lactating female rats. *Hormones and Behavior*. v.36, p.242-51, 1999.
- LOIZOU, L. A. The postnatal ontogeny of monoamine-containing neurones in the central nervous system of the albino rat. *Brain Research*, v.40, p.395-418, 1972.
- LUCION A. B. Aversive stimulation during the stress-hyporesponsive period does not affect the Number of corticotroph cells in neonatal male rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.30, p.1463-66, 1997.
- _____. MURADAS, A.; TEIXEIRA, L. Effects of neonatal stimulation on behavior development in rats. *International Society for Developmental Psychobiology Annual Meeting*, New Orleans, USA, p.36, 1997.

- MAREN, S. Overtraining does not initiate contextual fear conditioning deficits produced by neurotoxic lesions of the basolateral amygdala. *Journal of Neuroscience*. v.18, p.3088-97, 1998.
- _____. Is there savings for pavlovian fear conditioning after neurotoxic basolateral amygdala lesions in rats? *Neurobiology of Learning and Memory*. v.76, p.268-83, 2001.
- _____. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends in Neurosciences*. v.22, p.561-67, 1999.
- MATTHEWS, K.; HALL, S. F.; WILKINSON, L. S.; *et al.* Retarded acquisition and reduced expression of conditioned locomotor activity in adult rats following repeated maternal separation: effects of prefeeding, d-amphetamine, dopamine antagonists and clonidine. *Psychopharmacology*. v.126, p.75-84, 1996.
- MEANEY, M. J.; AITKEN, D. H.; BHATNAGAR, S.; SAPOLSKY, R. M. Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. *Neurobiol. Aging*. v.12, p.31-8, 1991.
- _____. BRAKE, W.; GRATTON, A. Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: a neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? *Psychoneuroendocrinology*. v.27, p.127-38, 2002.
- _____. DIORIO, J.; FRANCIS, D.; *et al.* Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev. Neurosci*. v.18, p.49-72, 1996.
- _____. DORIO, 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. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. v.746, p.260-73, 1994.
- _____. MITCHELL, D. H.; AITKEN, S.; *et al.* The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocrinology*. v.16, p.85-103, 1991.
- _____. SEEMA, B.; 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. *Ann. N. Y. Acad. of Sci*. v.697, p.70-85, 1993.
- MEERLO, P.; HORVATH, K.M.; NAGY, G.M.; BOHUS, B.; KOOLHAAS, J.M. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *Journal of Neuroendocrinology*. v.11, p. 925-33, 1999.
- MOORE, R.Y.; BLOOM, F.E. Central catecholamine neuron systems: Anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annual Reviews of Neuroscience*. v.1, p.129-69, 1978.

- MOOS, F.; RICHARD, P. Excitatory effect of dopamine on oxytocin and vasopressin reflex releases in the rat. *Brain Research*. v.241, p.249-60, 1982.
- MUNRO, L. J., KOKKINIDIS, L. Infusion of quinpirole and muscimol into the ventral tegmental area inhibits fear-potentiated startle: implications for the role of dopamine in fear expression. *Brain Research*. v.746, p.231-8, 1996.
- NAKAMURA, H.; MOROGI, T.; NOHARA, S.; NAKAMURA, H.; OKADA, A. Activation of cerebral dopaminergic systems by noise and whole-body vibration. *Environmental Research*. v.10, n.18, 1992.
- OADES, R. D. e HALLIDAY, G. M. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. *Brain Research Reviews*. v.12, p.117-65, 1987.
- OGAWA, T.; MIKUNI, M.; KURODA, Y.; *et al.* Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative *feedback* regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. v.49, n.4, p.961-67, 1994.
- PADOIN, M. J.; CADORE, L. P.; GOMES, C. M.; BARROS, H. M. T.; LUCION, A. B. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behavioural Neuroscience*. v.115, n.6, p.1332-40, 2001.
- PAPAIOANNOU, A.; DAFNI, U.; ALIKARIDIS, F., *et al.* Effects of neonatal handling on basal and stress-induced monoamine levels in the male and female rat brain. *Neuroscience*. v.14, n.1, p.195-206, 2002.
- _____. GEROZISSIS, K.; PROKOPIOU, A. Sex differences in the effects of neonatal handling on the animal's response to stress and the vulnerability for depressive behaviour. *Behavioural Brain Research*. v.129, p.131-39, 2002.
- PAXINOS, G. *The Rat Nervous System*. 2ed. Sydney: Academic Press, 1995.
- _____. e WATSON, C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. 3 ed. Orlando: Academic Press, 1997.
- PENKE, Z., FELSZEGHY, K.; FERNETTE, B.; SAGE, D.; *et al.* Postnatal maternal deprivation produces long-lasting modifications of the stress response, feeding and stress-related behavior in the rat. *European Journal of Neuroscience*. v.14,n.4, p.747-55, 2001.
- _____. FERNETTE, B., NYAKAS, C. *et al.* Neonatal maternal deprivation modifies feeding in response to pharmacological and behavioural factors in adult rats. *Neuropharmacology*. v.42, n.3, p.421-7, 2002.
- PETERS, S. L.; GRAY, J. A.; JOSEPH, M. H.; *et al.* Pre-weaning non-handling of rats disrupts latent inhibition in males, and results in persisting sex-and area dependent increases in dopamine and serotonin turnover. *Behavioural Pharmacology*. v.2, p.215-23, 1991.
- PEZZE, M. A.; HEIDBREDE, J.; MURPHY, C. A. Selective responding of nucleus accumbens core and shell dopamine to aversively conditioned contextual and discrete stimuli. *Neuroscience*. v.108, n.1, p.91-102, 2001.

- PLOTSKY, P. M, MEANEY, M. J. Early postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research*. v.18. p.195-200, 1993a.
- _____. MEANEY, M. J. Effects of early environment on hypothalamic-corticotrophin-releasing factor mRNA, synthesis, and stress-induced release. *Molecular Brain Research*. v.18, p.195-200, 1993b.
- REICHLIN, S. Neuroendocrinology: hypothalamus and pituitary. In: Wilson, J.D.; Foster, D.W.; Kronenberg, H.M.; Larsen, P.R. (eds). *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998.
- RHEES, R., LEPHART, E., ELIASON, D. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behavioral Brain Research*. v.123. p.1-10, 2001.
- ROSENFELD, P.; GUTIERREZ, Y.R.; MANTIN, A.M.; MALLET, H.A.; ALLEVA, E.; LEVINE, S. Maternal regulation of the adrenocortical response in preweanling rat. *Physiology and Behavior*. v.50, p.661-671, 1991.
- ROSENFELD, P.; SUCHECKI, D.; LEVINE, S., Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development. *Neurosci Biobehav Rev*, v.16, n.4, p.553-68, 1992.
- SAPOLSKY, R.M.; MEANEY, M. J. Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Research Reviews*. v.11, p.65-76, 1986.
- SCHANBERG, S.M.; FIELD, T.M. Sensory deprivation and supplemental stimulation in the rat pup and preterm human neonate. *Child Development*, v.58 p.1431-1447, 1987.
- SCHWARTZ, J.H. Chemical messengers: small molecules and peptides. In: Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessel, T.M. (eds). *Principles of Neural Science*. Norwalk: Appleton e Lange, Part III, 1991.
- SIRCAR, R.; MALLINSON, K.; GOLDBLOOM, L. M., *et al*. Postnatal stress selectively upregulates striatal N-methyl-d-aspartate receptors in male rats. *Brain Research*. v.904, p.145-48, 2001.
- SHALEV, U.; KAFKAFI, N. Repeated maternal separation does not alter sucrose-reinforced and open-field behaviors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. v.73, p.115-22, 2002.
- SKINNER, B. F. *Ciência e Comportamento Humano*. 9ed. São Paulo: Martins Fontes, 1994.
- STANFORD, G.; ZIGMOND M. Dopamine and Stress. in FINK, G. *Encyclopedia of Stress*. San Diego: Academic Press, 2000.
- STANTON, M.E.; GUTIERREZ, Y.R.; LEVINE, S. Maternal deprivation potentiates pituitary-adrenal stress responses in infant rats. *Behavioural Neurosciences* . v.102, p.692-700, 1988.
- SUCHECKI, D.; MOZZAFFARIAN, D.; GROSS, G.; ROSENFELD, P.; LEVINE, S. Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant

- rat. *Neuroendocrinology*. v.57, p.204-212, 1993.
- _____. PALMA, BD, TUFIK, S. Pituitary-adrenal axis and behavioural responses of maternally deprived juvenile rats to the open field. *Behavioural Brain Research*, v. 111, p.99-106, 2000.
- _____. ROSENFELD, P.; LEVINE, S. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Res Dev Brain Res*. v.75, n.2, p. 185-92, 1993.
- _____. TUFIK, S. Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats. *Am J Physiol*. v.273, n.4, 1997.
- SUDHA, S.; PRADHAN, N. Stress-induced changes in regional monoamine metabolism and behavior in rats. *Physiology and Behavior*. v.57, n.6, p. 1061-66, 1995.
- SWANSON, L. W. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Research Bulletin*. v.9, p.321-53, 1982.
- SZAFARCZYK, A.; GUILLAUME, V.; CONTE-DEVOLX, B.; et al. Central catecholaminergic system stimulates secretion of CRH at different sites. *Journal of the American Physiological Society*. v.1, p.463-67, 1988.
- TANG, J.; WOTJAK, C. T.; WAGNER, S.; et al. Potentiated amygdaloid auditory-evoked potentials and freezing behavior after fear conditioning in mice. *Brain Research*. v.919, p.232-41, 2001.
- TODESCHINI, A. S. *Efeitos da manipulação e separação dos filhotes no período neonatal sobre o comportamento da mãe*. 2002. 53f. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- TRULSON, M. E.; PREUSSLER, D. W. Dopamine-containing ventral tegmental area neurons in freely moving cats: activity during sleep-waking cycle and effects of stress. *Experimental Neurology*. v.83, p.367-77, 1984.
- TSAI, C. The descending tracts of the thalamus and midbrain of the opossum, *Didelphis virginiana*. *The Journal of Comparative Neurology*. v.39, n.2, p.217-48, 1925.
- VALLÉE, M.; MAYO, W.; DELLU, F.; et al. Prenatal stress induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J. Neurosci*. v.17, p.2626-36, 1997.
- VAN DE KAR, L. D., BLAIR, M. L. Forebrain Pathways Mediating Stress-Induced Hormone Secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology*. n.20, p.1-48, 1999.
- VAN OERS, H.J.J.; DE KLOET, E.R.; LI, K.; LEVINE, S. The ontogeny of glucocorticoid negative *feedback*: influence of maternal deprivation. *Endocrinology*. v.139, n.6, p. 2838-46, 1998.
- _____. KLOET, E. R.; WHELAN, T., et al. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and

- feeding but not by suppressing corticosterona. *The Journal of Neuroscience*. v.18, n.23, p.10171-79, 1998.
- VENTURA, R. CABIB, S. PUGLISI-ALLEGRA, S. Opposite genotype-dependent mesocorticolimbic dopamine response to stress. *Neuroscience*. v.104, n.3, p.627-31, 2001.
- VON OERSTEN, S.; DIMITRIJEVIC, M.; MARKOVIC, B. Effect of early experience on behavior and immune response in the rat. *Physiology Behavior*. v.54, n.5, p.931-40, 1993.
- WALKER, C.D.; PERRIN, M.; VALE, W.; RIVIER, C. Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology*. v.118, n.4, p.1445-51, 1986.
- WATANABE, H. Activation of dopamine synthesis in mesolimbic dopamine neurons by immobilization stress in the rat. *Neuropharmacology*. v.23, p.1335-38, 1984.
- WEINBERG, J.; KRAHN, E. A.; LEVINE, S. Differential effects of handling on exploration in male and female rats. *Development Psychobiology*. v.11, p.251-59, 1978.
- WEINER, I.; FELDON, J.; ZIV-HARRIS, D.; *et al.* Early handling and latent inhibition in the conditioned suppression paradigm. *Development Psychobiology*. v.20, p.233-40, 1987.
- WIGGER, A. NEUMANN, I. D. Periodic Maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiology and Behavior*. v.2, p.293-302, 1999.
- XAVIER, G. F. *Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso*. São Paulo: Plêiade, 1999.
- ZHANG, L. X., LEVINE S., DENT, G. *et al.* Maternal deprivation increases cell death in the rat brain. *Brain Research Dev Brain Res*. v.133, n.1, p.1-11, 2002.
- ZIGMOND, M. J., BLOOM, F. E., LANDIS, S. C.; *et al.* *Fundamental Neuroscience*. San Diego: Academic Press, 1999.