



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

**EFEITOS DE INTERVENÇÕES NO AMBIENTE NEONATAL SOBRE
A RELAÇÃO MÃE-FILHOTE E O COMPORTAMENTO
DOS RATOS NA IDADE ADULTA**

Márcia Scherem de Azevedo

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Giovenardi

Porto Alegre – RS

2005



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

**EFEITOS DE INTERVENÇÕES NO AMBIENTE NEONATAL SOBRE
A RELAÇÃO MÃE-FILHOTE E O COMPORTAMENTO
DOS RATOS NA IDADE ADULTA**

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

Márcia Scherem de Azevedo

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Giovenardi

**Porto Alegre – RS
2005**

*“Dê-me, Senhor,
agudeza para entender,
capacidade para reter,
método e faculdade para aprender,
sutileza para interpretar,
graça e abundância para falar.*

*Dê-me, Senhor,
acerto ao começar,
direção ao progredir
e perfeição ao concluir.”*

São Tomás de Aquino

Agradecimentos

Ao meu orientador Aldo Bolten Lucion pela oportunidade de orientação deste trabalho, pela paciência, confiança, incentivo e pelo seu exemplo de professor e pesquisador.

À minha co-orientadora e amiga Márcia Giovenardi, por todo seu apoio e incentivo desde a Iniciação Científica. Obrigada por sempre acreditar e confiar em meu trabalho.

Ao Professor Gilberto Luiz Sanvitto pelas contribuições ao longo de meu trabalho.

Aos Professores Alberto Rasia Filho, Rosa Maria de Almeida e Christian Haag Kristensen pela amizade e por todas as contribuições realizadas ao longo de meu caminho científico.

Ao colega e amigo Dirson Stein, por todo o cuidado e dedicação com os animais e por sua grande competência no trabalho.

Ao Professor Celso Rodrigues Franci, e a Sônia Zanon Baptista pela realização do radioimunoensaio.

À minha grande amiga Juliana de Castilhos que esteve presente em todos os momentos, sempre me incentivando e me apoiando. Obrigada pela amizade.

Aos grandes amigos, Charlis Rainecki, Fernando Benetti e Márcio Donadio pela amizade e companheirismo durante este período.

Às colegas e amigas Carmen Marilei Gomes, Ana Lúcia Ceconello, Anelise Todeschini, Natalia Uriarte e Clarice Sandi Madruga pela amizade, apoio e incentivo.

À colega e amiga Fabiana Leopoldo de Sousa, sem a qual eu não teria conseguido realizar este trabalho, muito obrigado por tudo.

Aos colegas de Laboratório Márcia Breijeiron, Gabriela Severino, Elisa Winkelmann, Caroline Veiga, Tatiane Cagol, Rosane Aparecida Ribeiro e os

demais colegas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Aos colegas do Laboratório de Neurociência da UNISINOS, onde realizei este trabalho, pela amizade, convivência e auxílio na realização de minhas pesquisas. Em especial aos colegas João Francisco Machado Silveira e Dariane Rabaioli que contribuíram de forma direta na realização deste trabalho.

Aos meus pais que sempre me deram incentivo para viver, e proporcionaram com que eu chegasse aqui me apoiando em todos os momentos. Obrigado por me ensinar a ciência da vida.

À minha grande irmã com a qual eu cada dia aprendo um pouco mais a viver. Obrigada por sempre estar presente em minha vida e por me aturar em todos os momentos.

À Valquiria por me incentivar a nunca desistir e a sempre mostrar que tudo tem um lado bom. Obrigada pelo aprendizado de vida.

Aos meus amigos, que sempre estiveram presente nas minhas conquistas.

Às secretárias da Pós-graduação Alice, Uíra, Fabiana e Andréa pela disponibilidade e auxílio nos momentos em que precisei.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Mestrado.

À UNISINOS pelo apoio financeiro e por conceder o espaço para a realização do meu projeto.

À FAPESP, FAPERGS E CAPES pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	vi
Lista de Abreviaturas.....	ix
Resumo.....	xi
Introdução.....	01
Resposta de um organismo ao estresse.....	02
Período hiporresponsivo ao estresse.....	04
Estimulação neonatal.....	06
Separação maternal.....	09
Estimulação tátil com pincel.....	11
Comportamento maternal.....	12
Justificativa.....	17
Objetivos.....	19
Material e Métodos.....	22
Animais.....	23
Grupos experimentais.....	24

EXPERIMENTO 1.....	25
Registro do comportamento maternal.....	25
Avaliação da massa corporal dos filhotes.....	26
EXPERIMENTO 2.....	26
Registro comportamental no campo aberto.....	27
EXPERIMENTO 3.....	27
Canulação da veia jugular.....	28
Estresse.....	28
Coleta de sangue.....	28
Radioimunoensaio.....	29
Análise Estatística.....	29
Resultados.....	37
Discussão.....	57
Conclusões.....	67
Referências Bibliográficas.....	70

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Procedimento experimental do grupo não manipulado.....	31
Figura 02 - Procedimento de manipulação neonatal por 10 minutos.....	32
Figura 03 - Procedimento experimental do grupo separado.....	33
Figura 04 - Procedimento experimental do grupo estimulado tatilmente, com o auxílio de um pincel.....	34
Figura 05 - Resumo esquemático dos grupos experimentais.....	35
Figura 06 - Registro comportamental no campo aberto.....	36
Figura 07 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento maternal de lamber os filhotes.....	41
Figura 08 - Média (\pm EPM) da duração do comportamento maternal de lamber os filhotes.....	42
Figura 09 - Média (\pm EPM) da latência do maternal de lamber os filhotes.....	43
Figura 10 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento maternal de amamentação com dorso arqueado.....	44

Figura 11 - Média (\pm EPM) da duração do comportamento maternal de amamentação com dorso arqueado.....	45
Figura 12 - Média (\pm EPM) da latência do comportamento maternal de amamentação com dorso arqueado.....	46
Figura 13 - Média (\pm EPM) da massa corporal (g) das ninhadas aos 11 dias de idade.....	47
Figura 14 - Média (\pm EPM) da massa corporal (g) das ninhadas aos 21 dias de idade.....	48
Figura 15 - Média (\pm EPM) da frequência de entradas no centro do campo aberto em ratos machos adultos.....	49
Figura 16 - Média (\pm EPM) do tempo de permanência no centro do campo aberto em ratos machos adultos.....	50
Figura 17 - Média (\pm EPM) da latência de entrada no centro do campo aberto em ratos machos adultos.....	51
Figura 18 - Média (\pm EPM) da frequência de locomoção total no campo aberto em ratos machos adultos.....	52
Figura 19 - Média (\pm EPM) da duração de locomoção total no campo aberto em ratos machos adultos.....	53
Figura 20 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento de <i>rearing</i> no campo aberto em ratos machos adultos.....	54
Figura 21 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento de <i>escanear</i> no campo aberto em ratos machos adultos.....	55
Figura 22 - Média (\pm EPM) das concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) em ratos machos adultos submetidos ao estresse por contenção.....	56

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

AVP – Arginina-vasopressina

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina

GH - Hormônio do Crescimento

HPA – Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

HPG - Hipotálamo-Hipófise-Gônada

LC – *Locus Coeruleus*

NA – Noradrenalina

NTS - Núcleo do Trato Solitário

ODC - Ornitina Descarboxilase

PRL - Prolactina

PVN – Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

SN – Sistema Nervoso

SNC – Sistema Nervoso Central

Resumo

RESUMO

O período neonatal corresponde ao período onde as primeiras ligações sociais do animal são formadas e o organismo está muito sensível aos efeitos de estímulos ambientais. Nas últimas décadas, tem havido um grande interesse em compreender quais fatores do ambiente neonatal e de que forma estes fatores podem exercer influência na fisiologia e no comportamento de animais que tiveram qualquer tipo de intervenção neste período. Quando adultos, os animais que sofreram intervenção neonatal apresentam uma menor secreção de corticosterona e um retorno mais rápido a concentração basal, quando submetidos a estímulos estressores. Além de alterar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, estudos demonstram que ratas manipuladas apresentam ciclos estrais anovulatórios e há uma redução do comportamento sexual tanto em machos quanto em fêmeas, alterando assim o eixo hipotálamo-hipófise-gônada. A intervenção neonatal também altera a relação mãe-filhote. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo analisar se diferentes tipos de intervenção ambiental (manipulação, separação e estimulação com pincel) promovem alguma alteração na relação mãe-filhote e no comportamento dos animais adultos.

Ao parirem (Dia 0), as ratas com suas ninhadas foram divididas em quatro grupos: não manipulado (controle), que não foram tocados durante os 10 primeiros dias após o nascimento; manipulados, que foram manipulados gentilmente pelo experimentador durante 10 minutos por dia, nos 10 primeiros dias de vida; separados, que foram separados da mãe durante 10 minutos por dia, nos 10 primeiros dias de vida; e estimulação tátil com pincel, que foram separados da mãe durante 10 minutos por dia, nos 10

primeiros dias de vida, e durante este tempo foram estimulados com o auxílio de um pincel

No experimento 1 foi realizado o registro do comportamento maternal, após o procedimento experimental, no 1º, 5º e 10º dia pós-parto. Neste experimento, foram analisados o comportamento da mãe de lambe os filhotes e de amamentação com dorso arqueado.

No experimento 2 os ratos machos com aproximadamente 90 dias de idade e que sofreram intervenção neonatal, passaram pela análise comportamental. Foi analisada a exploração a ambientes novos e medo no campo aberto. No experimento 3, foi analisada a resposta da liberação de prolactina após estresse por contenção, também nos ratos machos com cerca de 90 dias de idade que sofreram intervenção neonatal.

Os resultados mostram que ratas, cujos filhotes foram manipulados no período neonatal apresentam um aumento na duração do comportamento de lambe em relação aos grupos não manipulados, separado e estimulação tátil com pincel. No campo aberto ocorreu uma redução na latência de entradas no centro do campo aberto, bem como um aumento no tempo de permanência no centro, em ratos que foram separados e manipulados em relação aos demais. Nossos resultados mostram também que todos os grupos apresentaram um aumento na resposta da prolactina plasmática quando submetidos ao estresse após 15 minutos de contenção.

Introdução

INTRODUÇÃO

Resposta de um organismo ao estresse

A homeostase é um processo de coordenação fisiológica o qual mantém estável a maior parte dos estados no organismo. Este equilíbrio estável pode ser constantemente ameaçado por uma variedade de distúrbios ou estímulos, tanto externos quanto internos. Nestas situações de ameaça ou perigo, os organismos desencadeiam diversas respostas adaptativas que visam manter a homeostasia, chamadas de respostas ao estresse. As respostas ao estresse que habilitam um organismo a enfrentar uma ameaça ou desafio de estímulos ambientais consistem em um complexo conjunto de componentes endócrinos, neurovegetativos e comportamentais (Meerlo et al., 1999).

Os dois principais sistemas neuroendócrinos envolvidos em integrar as respostas a um estressor são o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o sistema neurovegetativo simpático. A ativação do eixo HPA resulta na liberação de cortisol ou corticosterona do córtex da adrenal. O aumento da atividade catecolaminérgica e da ativação deste eixo integrado com diversos outros sistemas neuroendócrinos,

regulam a função vascular e a captação de energia, facilitando as respostas comportamentais adequadas e servindo para manter a homeostase (Meaney et al., 1993; Meerlo et al., 1999). Para que isto ocorra, os neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo, sintetizam e secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina-vasopressina (AVP), que irão atuar ativando a hipófise anterior e promovendo a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este, por sua vez irá promover a secreção de glicocorticóides pelo córtex da adrenal (Handa et al., 1994; Francis et al., 1996; Herman & Cullinan, 1997).

Os glicocorticóides, em um organismo adulto, servem para regular diversas funções que visam à manutenção dos processos metabólicos básicos, bem como a regulação de um organismo em resposta ao estresse. No homem, o glicocorticóide de maior importância é o cortisol e no rato, a corticosterona. A maior parte dos efeitos da corticosterona são rapidamente revertidos em um organismo adulto, entretanto a administração deste hormônio durante o desenvolvimento tem mostrado efeitos permanentes no crescimento e na diferenciação de diversos sistemas, incluindo o sistema nervoso central (SNC) (Levine, 2001).

A ativação do sistema neurovegetativo simpático também é induzida em resposta ao estresse e resulta na liberação de noradrenalina (NA) nos terminais sinápticos e pela medula da adrenal na corrente sanguínea, onde, junto com os glicocorticóides irão aumentar a lipólise, a glicogenólise e o catabolismo de proteínas. Além desta descarga periférica, o estresse também induz a secreção de noradrenalina no SNC, sendo que grande parte origina-se no *Locus coeruleus* (LC) (Melia & Duman, 1991; Konstandi et al., 2000). Assim, as catecolaminas promovem diversas alterações nas funções

vegetativas, o que irá contribuir para que o organismo mantenha o equilíbrio homeostático durante o estresse (Kopin, 1995).

A corticosterona é um dos principais hormônios avaliados na resposta a diversos tipos de estressores, entretanto a prolactina (PRL) também responde a esses estímulos, sendo utilizada como um eficiente marcador da resposta ao estresse. Em ratos, tanto em machos quanto em fêmeas, a exposição aguda a diversos tipos de estressores resulta em um considerável aumento nos níveis plasmáticos de prolactina (Wilson et al., 2000). Dentre os estímulos estressores, podemos citar o estresse por éter, por contenção, e por calor (Freeman et al., 2000). Diferentemente da resposta da corticosterona, que é mais tardia e prolongada, a prolactina retorna aos níveis basais dentro de aproximadamente 15 minutos. Foi demonstrado que, o pico de concentração plasmática de PRL ocorre entre 2 e 5 minutos após o estresse por exposição ao éter e o retorno às concentrações basais ocorre após 5 minutos (Wakabayashi et al., 1971). Sendo assim, os níveis de PRL juntamente com os de ACTH podem ser considerados, como índice quantitativo das respostas a diferentes estressores (Freeman et al, 2000).

Período hiporresponsivo ao estresse

Ao nascerem os mamíferos não estão com o sistema nervoso (SN) plenamente desenvolvido. Logo após o nascimento, o SN de ratos, é sensível a alterações ambientais. O desenvolvimento de respostas adaptativas ao estresse pode ser modificado por eventos que ocorrem nesta época (Meaney et al., 1993). Durante as duas primeiras semanas de vida, em ratos, a concentração de

corticosterona plasmática é baixa e permanece assim até aproximadamente o 14º dia de vida. Além disso, as concentrações hipofisárias de ACTH, e hipotalâmicas de CRH, também são diminuídas neste período. Assim, estímulos que normalmente induziriam o aumento de ACTH em adultos são incapazes de fazê-lo em animais neonatos, durante esta fase. Este período é chamado de período hiporresponsivo ao estresse (Levine, 2001; Sapolsky & Meaney, 1986).

Em geral, há uma redução da resposta do eixo HPA a maior parte dos estressores no período hiporresponsivo ao estresse, entretanto esta resposta é muito variável, dependendo da idade do animal, do tempo e do tipo de estressor ao qual ele é submetido (De Kloet et al., 1998). Foi demonstrado que o eixo HPA de ratos neonatos responde a estímulos ambientais de uma maneira peculiar, diferente de um animal adulto (Dent et al., 2000). Neste período ocorre uma grande captação de glicocorticóides pela hipófise, demonstrando um aumento da sensibilidade do eixo HPA, induzindo uma redução na secreção de ACTH em resposta a altos níveis de CRH (Sapolsky & Meaney, 1986).

Em ratos, a administração de altas doses de glicocorticóides causa um decréscimo na mitose, na mielinização e altera a neuromorfogênese (Bohn, 1980). Sendo assim, a manutenção de uma baixa concentração de corticosterona durante o desenvolvimento do rato é necessária para um desenvolvimento normal do animal (Levine, 2001). O período hiporresponsivo ao estresse é, então, um importante mecanismo para proteger o filhote de uma secreção aumentada de glicocorticóides, durante o período crítico de desenvolvimento cerebral (Sapolsky & Meaney, 1986). Devido a este fator, o neonato necessita do cuidado maternal nesta fase, para

diminuir a exposição do mesmo a estressores (Sapolsky & Meaney, 1986).

Estimulações aparentemente inofensivas ou estímulos estressores como frio e choque elétrico Durante o período hiporresponsivo ao estresse, induzirão alterações comportamentais e endócrinas na vida adulta devido à baixa reatividade corticoadrenal (Levine, 1994). Eventos estressantes durante este período podem influenciar tanto na maturação do eixo HPA, quanto no comportamento do rato na vida adulta (Aguar et al., 1997). Sendo assim, estudos que envolvem modelos de estresse neonatal podem ser uma ferramenta importante na investigação das interações entre o ambiente e as alterações na vida adulta (Meerlo et al., 1999).

Estimulação neonatal

O período neonatal corresponde à fase onde as primeiras ligações sociais do animal são formadas (Scott, 1962). Neste período o organismo está muito sensível aos efeitos de estímulos ambientais. As alterações comportamentais e neuroendócrinas induzidas pela estimulação neonatal parecem perdurar ao longo da vida do animal (Francis et al., 1996).

Fatores externos, como a presença da mãe, podem interferir nos processos fisiológicos dos filhotes (Suchecki et al., 1993). O comportamento de ratos adultos que foram manipulados no período neonatal é afetado pelos estímulos ambientais combinados com a resposta imediata da mãe aos filhotes (Villescas et al., 1977).

Nas últimas décadas tem havido um grande interesse em saber quais são os fatores do ambiente neonatal e de que forma estes

fatores podem exercer influência na fisiologia e no comportamento de animais que tiveram qualquer tipo de intervenção no período neonatal. Os modelos experimentais de estimulação e separação neonatal têm sido utilizados para esta análise (Kalinichev et al., 2002).

A intervenção neonatal altera a relação mãe-filhote (Liu et al., 1997) e a influência maternal nas preferências sociais e sexuais em mamíferos (Beauchamp & Hess, 1973; Kendrick et al., 1998). A intervenção neonatal tem como objetivo avaliar como uma interferência ambiental nos primeiros dias de vida pode promover mudanças fisiológicas, bem como respostas neuroendócrinas e comportamentais, na vida adulta (Denenberg, 1964; Levine et al., 1967; Hess et al., 1969; Sieck & Ramaley, 1975; Lehmann et al., 1999; Kalinichev et al., 2002).

A estimulação durante o período neonatal pode inibir a atividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC) (Schanberg & Kuhn, 1995). Esta enzima é limitante na síntese de poliamidas e se encontra em alta concentração nas células em divisão de tecidos em crescimento (Gilad et al., 2000).

A manipulação, durante as duas primeiras semanas de vida de roedores, diminui a responsividade do eixo HPA ao estresse em animais adultos (Levine, 1993; Meaney et al., 1996; Liu et al., 2000). Esta manipulação altera a diferenciação do eixo HPA, promovendo mudanças nos padrões comportamentais e de resposta ao estresse em animais adultos (Levine et al., 1967; Hess et al., 1969; Levine, 1993; Meaney et al., 1993; Núñez et al., 1996; Meaney et al., 1996; Meerlo et al., 1999; Liu et al., 2000; Levine, 2001). Foi demonstrado que o modelo de manipulação causa uma redução nas concentrações de mRNA para o CRH na amígdala central e um menor conteúdo

deste hormônio no LC (Francis et al., 1999). Existe também uma atenuação da ativação do LC induzida pelo CRH, o que resulta em pequenos aumentos de noradrenalina do PVN no hipotálamo, após o estresse por contenção (Liu et al., 2000).

Os animais manipulados no período neonatal também apresentam um aumento de receptores GABAérgicos nas células noradrenérgicas do LC e do núcleo do trato solitário (NTS), assim como um aumento de receptores benzodiazepínicos na amígdala central, LC e NTS (Francis et al., 1999; Caldji et al., 2000).

Lucion et al. (1999) demonstraram que a manipulação neonatal pode afetar o número de neurônios em diferentes áreas do SNC de ratos. A manipulação promove na amígdala medial, uma diminuição no número de neurônios aos 11 e 90 dias de idade, como também nos neurônios das camadas 2 e 3 do córtex frontal aos 11 dias de idade, em ratos machos e fêmeas. Ratos manipulados também apresentam uma redução no número e no volume de células no LC, tanto em machos quanto em fêmeas, quando comparados ao grupo controle (Lucion et al., 2003).

A manipulação neonatal também causa alterações comportamentais. Em ratos, reduz respostas emocionais no adulto expressadas por um aumento na atividade exploratória, a qual é interpretada pelo medo a ambientes novos (Levine et al., 1967; Bodnoff et al., 1987; Fernandez-Teruel et al., 1991). Isto foi observado tanto em machos quanto em fêmeas (Padoin et al., 2001). O comportamento sexual também sofre uma diminuição em ambos os sexos, em animais que sofreram manipulação neonatal (Padoin et al., 2001). Outro comportamento que se apresenta alterado após este estímulo neonatal é o agressivo maternal. A manipulação aumenta este comportamento em fêmeas lactantes (Padoin et al., 2001).

Vários estudos mostram que a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) pode sofrer alterações em animais que foram manipulados no período neonatal. Fêmeas manipuladas durante este período, além de apresentarem uma diminuição no comportamento sexual, (Padoin et al., 2001) apresentam ciclos estrais anovulatórios o que demonstra uma capacidade reprodutiva reduzida (Gomes et al., 1999). Gomes et al. (2005), demonstraram que hormônios relacionados à ovulação e ao comportamento sexual em fêmeas, também estão alterados em ratos que foram manipulados nas duas primeiras semanas de vida.

A manipulação de ratos no período pós-natal pode afetar o desempenho em tarefas de aprendizado, além da reatividade ao estresse (Anisman et al., 1998). A manipulação, ou qualquer outro tipo de intervenção do animal no período neonatal provoca distúrbios na relação mãe-filhote (Levine, 1993).

Separação maternal

A separação maternal consiste em afastar os filhotes da mãe por um período que pode variar de 10 minutos a 24 horas, durante as duas primeiras semanas de vida. Os diferentes tempos de separação irão causar diferentes respostas no animal adulto. Este rompimento mãe-filhote pode alterar a diferenciação no SN dos filhotes.

A atividade do eixo HPA em ratos neonatos parece depender da presença da mãe, uma vez que a resposta ao estresse é maior em animais que foram separados por um único período de 24 horas da mãe do que naqueles em que a relação mãe-filhote não sofreu interferência (Suchecki et al., 1993). Estes resultados sugerem que o

eixo HPA parece estar quiescente nos ratos neonatos devido à presença da mãe (Smith et al., 1997). A separação neonatal induz mudanças permanentes no desenvolvimento neuronal, produzindo alterações comportamentais, neuroquímicas e imunológicas (Mathews et al., 1996).

Estudos demonstram que ratos adultos, separados da mãe por 180 minutos por dia no período neonatal, apresentam aumento nos níveis de mRNA de CRH no PVN, hipersecreção de ACTH e de corticosterona em resposta a um estímulo estressante, e aumento do retorno aos níveis basais desses hormônios, quando comparados a ratos que foram separados por 15 minutos neste mesmo período (Plotsky & Meaney, 1993; Huot et al., 2001). Animais separados por 180 minutos apresentam maior liberação de ACTH e NA em resposta ao estresse por contenção em relação a animais controle, entretanto as concentrações basais permanecem iguais (Liu et al., 2000).

A separação por um único período de 24 horas, aos 11 dias de idade, causa uma redução na concentração dos receptores de glicocorticóides no PVN aos 20 dias de idade, entretanto este processo é revertido quando os filhotes recebem alimento e estímulo tátil na área anogenital (Van Oers et al., 1999).

Foi demonstrado, que a separação neonatal por 3 horas no período neonatal, aumenta a secreção de corticosterona em resposta ao estresse, em machos, e a ansiedade em resposta a variações ambientais (Kalinichev et al., 2002). Animais separados no período neonatal diminuem o comportamento agressivo maternal quando adultos (Boccia & Pedersen, 2001).

Ao contrário do que acontece com uma estimulação breve, que faz com que haja uma redução do medo a ambientes novos. Após a separação de 180 minutos durante o período neonatal, os animais

adultos apresentam um aumento na ansiedade, tanto em machos quanto em fêmeas. Isto é evidenciado por uma diminuição no número de entradas no braço aberto do labirinto em cruz elevado e no campo aberto há uma redução na locomoção em relação ao grupo controle (Wigger & Neumann, 1999).

A separação maternal altera o comportamento reprodutivo de ratos machos adultos que, quando separados da mãe no período neonatal, durante 6 horas por dia, apresentam um aumento na latência de montar uma fêmea receptiva (Rhees et al., 2001).

A separação diária de 180 minutos no período neonatal altera o comportamento alimentar em machos adultos que, quando privados de comida, apresentam uma latência maior em se aproximar do alimento após esta privação. Já os animais que foram manipulados por 15 minutos apresentam uma latência menor (Iwasaki et al., 2000).

Estimulação tátil com pincel

Variadas formas de estimulação tátil têm sido usadas em estudos de intervenção em filhotes prematuros com relativo sucesso (Field, 1980; Pauk et al., 1986). A estimulação tátil com pincel previne ou reverte os efeitos da separação maternal nos ratos filhotes e facilita o ganho de peso nos filhotes prematuros (Pauk et al., 1986). Ratos que foram separados no período neonatal apresentam uma redução na secreção de hormônio do crescimento (GH) e nos níveis da enzima que regula a síntese de poliamidas: a ODC. Este declínio pode ser devido à perda da estimulação tátil da mãe. Foi demonstrado que estímulos realizados nos filhotes com o auxílio de

um pincel podem reverter este declínio, normalizando a atividade do GH e da ODC (Schanberg et al., 1984).

Assim, essas alterações fisiológicas e endócrinas observadas em animais neonatos e adultos podem ser devidas à interferência na relação mãe-filhote, em um período crítico para o desenvolvimento do SNC de roedores. Mães que foram privadas durante algum período de suas ninhadas lambem, cuidam e ao amamentar adquirem uma postura de proteção, mantendo-se em cima dos filhotes com maior frequência do que aquelas cuja relação mãe-filhote não sofreu interferência (Liu et al., 1997).

Comportamento maternal

O comportamento maternal em ratas consiste de vários elementos integrados e que estão relacionados com a nutrição e o cuidado dos filhotes. Eles podem envolver diretamente os filhotes (amamentação, lambida, busca de filhotes) ou não (construção de ninhos, agressão maternal). Este padrão complexo aparece espontaneamente em mães primíparas. Perto da data do parto, a mãe inicia uma seqüência de mudanças comportamentais que visam receber adequadamente os filhotes. Ela muda seus padrões de limpeza corporal, levando mais tempo na limpeza da região mamária e, alguns dias antes do parto, ela constrói um ninho com o substrato disponível (Numan, 1994).

Uma das hipóteses que poderia explicar o rápido surgimento do comportamento maternal, seriam as mudanças hormonais que ocorrem no término da gestação (Numan, 1994). No final da gestação e durante os primeiros dias de lactação, a fêmea passa por

mudanças hormonais (Numan, 1994) e comportamentais importantes que induzem e habilitam-na a proteger e orientar a ninhada (Stern & Johnson, 1990).

Entretanto, uma vez estabelecida à interação mãe-filhote, a resposta maternal passa a ser induzida por estímulo dos filhotes, independentemente de hormônios (Leengood et al., 1987). A rata lactante precisa de vários estímulos, além das mudanças hormonais causadas pela gestação em si, para estabelecer uma resposta maternal. O principal estímulo é a presença dos filhotes, que atrai a atenção da mãe, com alguns comportamentos como vocalizações e movimentos do corpo (Polan & Hofer, 1999) e pelo olfato (Moore, 1985; Jans & Leon, 1983a).

Em ratos, o comportamento maternal ocorre com maior frequência nos primeiros dez dias após o parto, diminuindo gradualmente. Os filhotes de ratos, assim como a maioria dos roedores, nascem altriciais, isto é, são parcialmente imóveis, desprovidos de pêlos, surdos e cegos, incapazes de se locomover e de regular sua temperatura (Grota & Ader, 1969; 1975).

Durante o período da lactação, as mães apresentam comportamento de cuidar dos filhotes e manifestam-no pela busca dos mesmos quando estes se afastam do ninho, pela estimulação da micção por meio da lambida anogenital, pelo posicionamento sobre os filhotes para provê-los de nutrição e calor, construção do ninho e defesa contra intrusos (Grota & Ader, 1969; Stern & Johnson, 1990; Albert & Walsh, 1995). Nos primeiros dias de vida dos filhotes, as lactantes passam até 85% do tempo total junto deles (Grota & Ader, 1969). Elas podem se manter por cima da ninhada com uma postura arqueada, o que faz com que as mamas fiquem mais expostas e facilita a ejeção do leite pelo estímulo de sucção dos filhotes. A

postura cifótica só ocorre para filhotes vivos e quentes. Para essa postura, é necessário que os mesmos estejam presos aos mamilos (Stern & Johnson, 1990).

Até aproximadamente o 12º dia de vida, é a mãe que toma iniciativa de se aproximar dos filhotes. Após este período, os filhotes estão aptos a se locomoverem e a deixar o ninho, então são eles que se aproximam da mãe para requererem cuidados (Leon & Moltz, 1971). Nesta idade, a mãe não recolhe mais os filhotes; caso eles saiam do ninho, reconhecem a mãe pelos feromônios emitidos pelas fezes desta (Leon, 1974). Depois de duas semanas do nascimento há um declínio gradual dos cuidados maternos, até que ocorra a rejeição dos filhotes pela mãe no desmame, que ocorre aproximadamente aos 28 dias de vida (Reisbick et al., 1975).

Interações normais na relação mãe-filhote são importantes para o crescimento e desenvolvimento adequados dos mamíferos. A interrupção de estímulos sensoriais providos pela mãe tem efeitos negativos no desenvolvimento da ninhada em muitas espécies (Pauk et al., 1986; Schanberg & Kuhn, 1980). O contato físico ativo provido pela mãe é particularmente importante para a regulação dos processos de crescimento normal em filhotes de mamíferos. Alguns estudos têm demonstrado que mesmo a separação por um curto espaço de tempo deste contato maternal (privação maternal), produz uma série de efeitos no filhote (Pauk et al., 1986). Isso inclui uma redução na atividade ODC, que é um índice sensível de crescimento e diferenciação celular, na diminuição da secreção do GH, bem como um aumento na secreção de corticosterona (Anderson & Schanberg, 1975; Pauk et al., 1986). Estes efeitos não são relacionados a mudanças em fatores nutricionais ou regulação de temperatura, mas

resultam de uma alteração da estimulação maternal ativa (Kuhn et al., 1978).

Diversos estudos relacionados ao desenvolvimento de roedores demonstram que a mãe é responsável por regular diversas respostas fisiológicas nos filhotes, como por exemplo, a frequência cardíaca, os ciclos de sono/vigília e a produção de GH (Levine, 2001). Este autor demonstrou que ratos com duas semanas de idade, se separados por 24 horas da mãe, apresentam um decréscimo de 40% da frequência cardíaca. Este decréscimo ocorre devido à ausência do leite materno e pelo rompimento do contato maternal e é revertido assim que a mãe retorna (Levine, 2001).

Filhotes em que a mãe despense mais tempo para cuidá-los, lambendo-os mais, apresentam quando adultos um aumento de receptores para glicocorticóides no hipocampo e uma redução na secreção de ACTH e corticosterona em resposta ao estresse (Liu et al., 1997). Esta resposta é similar à de animais que são manipulados no período neonatal.

Em diversas espécies de mamíferos o papel do comportamento maternal é evidenciado em estudos de privação maternal (Champagne et al., 2003). Estudos demonstram que alterações ou interferências na relação mãe-filhote durante o período neonatal, como a manipulação ou a separação maternal, podem provocar distúrbios nessa relação, modificando o comportamento da mãe em relação aos filhotes. Mães de filhotes que foram manipulados no período neonatal cuidam mais da prole, ou seja, lambem mais seus filhotes quando comparadas a animais controle. Macri et al. (2004) demonstraram que animais que foram separados da mãe por um período de 3 horas, induziram um aumento no comportamento maternal quando comparados a animais controle. Portanto, postula-

se que alterações na relação mãe-filhote seriam responsáveis pelo padrão comportamental e neuroendócrino observado em ratos que sofreram intervenção no período neonatal.

Acredita-se que as intervenções realizadas no período hiporresponsivo ao estresse podem ter um efeito próprio, bem como podem induzir um aumento do comportamento maternal, devido a uma alteração na relação mãe-filhote. O procedimento realizado pelo experimentador seria um estímulo para aumentar o comportamento da mãe em relação à prole. Sendo assim, diversos estudos tentam esclarecer se os efeitos comportamentais e neuroendócrinos observados em um animal que sofreu intervenção no período neonatal são devidos à intervenção em si ou ao comportamento da mãe ao retornar para o ninho.

Justificativa

JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o período neonatal corresponde a uma fase onde as primeiras ligações sociais do animal são formadas e o organismo está muito sensível aos efeitos de intervenções ambientais. Alterações no período neonatal causam mudanças neuroendócrinas e comportamentais que parecem perdurar ao longo da vida do animal. Nas últimas décadas tem havido um grande interesse em compreender quais fatores do ambiente neonatal e como estes fatores influenciam a fisiologia e o comportamento dos animais. Dentre os vários fatores que vêm sendo estudados pela comunidade científica, a relação mãe-filhote parece interferir no desenvolvimento e nos processos fisiológicos dos filhotes e como consequência, nos seus comportamentos.

Este trabalho busca elucidar a seguinte questão: se as alterações neuroendócrinas e comportamentais observadas no animal adulto que sofreu intervenção neonatal são devidas ao aumento do comportamento maternal no retorno dos filhotes ao ninho ou ao tipo de intervenção (manipulação, separação ou estimulação tátil com pincel) que o filhote recebe no período neonatal.

Objetivos

OBJETIVO

Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo analisar se diferentes tipos de intervenção neonatal (manipulação, separação e estimulação com pincel) promovem alguma alteração na relação mãe-filhote, no comportamento dos filhotes quando adultos e na resposta ao estresse.

Objetivos específicos

- Comparar o efeito dos diferentes tipos de intervenções realizadas nos filhotes sobre o comportamento maternal de fêmeas com o comportamento de fêmeas lactantes cujos filhotes não tiveram nenhuma intervenção nos 10 primeiros dias de vida.

- Analisar o efeito dos diferentes tipos de intervenções neonatal sobre o comportamento exploratório de machos na idade adulta, pelo teste do campo aberto.

- Avaliar a concentração plasmática de prolactina (PRL) após estresse por contenção nos animais que sofreram intervenção no período neonatal.

Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas ratas prenhas, primíparas, da variedade Wistar, provenientes do biotério da Universidade do Vale do Rio dos Sinos. Estas ratas foram colocadas em caixas de acrílico transparente com maravalha servindo de substrato e tiveram o momento do parto controlado rigorosamente. No dia seguinte ao nascimento, as ninhadas foram padronizadas aleatoriamente em oito filhotes. Aos 21 dias de idade os filhotes foram desmamados e machos e fêmeas foram colocados em caixas separadas, até a idade adulta. Todos os animais foram mantidos no biotério sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas, com início da fase escura às 16:00 horas. 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.

Grupos experimentais

Ao parirem (dia 0), as ratas com suas ninhadas foram divididas em quatro grupos:

- **Não manipulado (controle):** animais que não foram tocados pelos experimentadores nem pelos tratadores durante os 10 primeiros dias após o nascimento (Figura 1). Após este período, as caixas eram limpas conforme a rotina do biotério.

- **Manipulados:** animais que foram separados da mãe e manipulados durante 10 minutos por dia, nos 10 primeiros dias de vida. A manipulação consistiu em retirar a mãe da caixa-residência e colocá-la em uma sala separada. Os filhotes foram afastados do ninho e gentilmente manipulados, todos juntos, pelo pesquisador que utilizou luvas de látex, durante 10 minutos. Logo após, os filhotes foram devolvidos para suas caixas-residência e a mãe era colocada junto a eles novamente (Figura 2).

- **Separados:** animais que foram separados da mãe durante 10 minutos por dia, nos 10 primeiros dias de vida (Figura 3). Neste procedimento a mãe foi retirada da caixa-residência e colocada em outra sala durante 10 minutos e os filhotes permaneceram na caixa-residência sem sofrer nenhum outro tipo de intervenção.

- **Estimulação tátil com pincel:** animais que foram separados da mãe durante 10 minutos por dia, nos 10 primeiros dias de vida e durante este período foram estimulados com o auxílio de um pincel (Figura 4). Para tanto, a mãe foi retirada da caixa-residência e colocada em uma sala separada. Os filhotes permaneceram no ninho e foram estimulados tatilmente com o auxílio de um pincel de cerdas macias, que foi passado vigorosamente no dorso dos mesmos por um período de 10 minutos.

Os procedimentos experimentais (Figura 5) foram realizados no ciclo claro e iniciaram no dia seguinte ao nascimento dos filhotes, determinado dia 1 e todos os grupos tinham suas caixas-residência limpas somente a partir do 11º dia após o nascimento.

EXPERIMENTO 1

Registro do comportamento maternal

Seqüência de filmagem do comportamento maternal

Os comportamentos da rata lactante com sua ninhada foram registrados em vídeo no 1º, 5º e 10º dia pós-parto, durante o ciclo claro. Os registros foram realizados por 30 minutos, a partir do momento em que a mãe era colocada novamente na caixa-residência, após os procedimentos experimentais.

Comportamentos observados

Os comportamentos observados durante o registro foram os de lambar os filhotes e amamentação com o dorso arqueado. Lambar os filhotes inclui lambar o corpo e a região anogenital dos mesmos. A mãe utiliza as patas dianteiras para virar o corpo do filhote, começando a lambar a região perineal do filhote, que pode urinar em resposta. O comportamento de lambar a região anogenital ocupa

mais tempo da mãe do que lambe outras regiões do restante do corpo (Moore, 1992).

A amamentação com o dorso arqueado ocorre em resposta ao estímulo na região ventral da mãe pelos filhotes. Neste comportamento a mãe curva o dorso, ficando com as patas traseiras e a cabeça imóveis sendo que as costas podem estar levemente arqueadas. Se houver um estímulo mais intenso dos filhotes, a mãe fica com o dorso em protuberante arco dorsal e as patas rigidamente esticadas e imóveis (Stern & Johnson, 1990).

Para os comportamentos descritos acima os parâmetros utilizados foram duração, frequência e latência para cada registro de 30 minutos.

Avaliação da massa corporal dos filhotes

Para avaliar a massa corporal, as ninhadas foram pesadas no 11º e no 21º dia de idade, durante a limpeza da caixa-residência.

EXPERIMENTO 2

Aproximadamente com 90 dias de idade, o comportamento no campo aberto dos ratos machos foi analisado.

Registro comportamental no campo aberto

O campo aberto consiste em uma caixa de madeira de 1m² (Figura 6) com paredes de 50cm de altura, com sua base dividida em quadrantes de 20cm², perfazendo um total de 25 quadrados, sendo 16 laterais (próximos às paredes) e nove centrais. O animal era colocado em um dos cantos, virado para a parede da caixa e registrou-se seu comportamento em vídeo por 5 minutos. Após cada registro o aparato experimental era totalmente limpo com álcool 70%, para a realização do próximo registro.

O teste foi realizado durante o ciclo claro e os comportamentos analisados foram: atividade exploratória (caracterizada pela locomoção total e permanência no centro), "escanear" e "rearing" (permanecer sob as duas patas traseiras investigando o ambiente, no centro do campo aberto ou nas laterais, respectivamente) (Blanchard & Blanchard, 1988; Blanchard et al, 1990; Lucion et al, 1996).

Todas as análises comportamentais deste trabalho foram registradas no programa Noldus® (Holanda) e submetidas à análise estatística para verificação de possíveis diferenças entre os grupos experimentais.

EXPERIMENTO 3

A resposta da PRL plasmática após estresse por contenção foi analisada em machos com cerca de 90 dias de idade.

Canulação da veia jugular

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com tribromoetanol (Aldrich Chem. Comp. Inc.) 2,5% em solução salina. A dose utilizada foi de 1mL por 100g de peso corporal. Uma cânula de silicone (0,59 x 0,99mm) foi introduzida no átrio direito através da veia jugular externa direita segundo técnica descrita por Harms & Ojeda (1974). As cirurgias foram realizadas às 16:00 horas na tarde anterior às coletas. Até o momento da coleta as cânulas ficavam preenchidas com solução fisiológica estéril. Após a cirurgia de canulação os ratos foram mantidos em caixas individuais.

Estresse

O estresse foi aplicado colocando o rato num tubo de contenção por 15 minutos. O tubo era plástico, com pequenas aberturas para a respiração do animal, medindo 14cm de comprimento e 6cm de diâmetro.

A primeira coleta de sangue foi realizada 2 minutos antes da colocação do animal no tubo e a segunda, 15 minutos após o rato estar no tubo de contenção.

Coleta de sangue

Todas as coletas de sangue foram realizadas em uma sala silenciosa. As coletas foram realizadas às 9:00h da manhã e cerca de 30 minutos antes da primeira coleta uma extensão de 20cm de polietileno (PE50), previamente lavada com soro heparinizado, foi

conectada à cânula de silicone e preenchida com soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%), com o objetivo de realizar as coletas de sangue sem ser necessária a manipulação do animal. Amostras de 600 μ L de sangue foram coletadas em seringas plásticas heparinizadas, aos 2 minutos antes do estresse e aos 15 minutos após o estresse. Após cada coleta um volume igual de solução fisiológica estéril foi repostado.

Em todos os grupos, as amostras de sangue foram colocadas em tubos plásticos, centrifugadas a 3000 rpm, a 4°C durante 15 minutos sendo o plasma separado e armazenado em um freezer a -70°C.

Radioimunoensaio

As concentrações plasmáticas de PRL foram determinadas por radioimunoensaio de duplo anticorpo usando kits específicos da National Institute of Arthritis, Diabetes and Kidney Diseases (NIADDK, Baltimore-USA). Os anticorpos específicos para PRL foram anti-rat PRL-S9 e a preparação padrão foi a PRL-RP3. O 2º anticorpo foi produzido pelo laboratório do Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci (Faculdade de Medicina - Depto. de Fisiologia da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto/SP).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o cálculo da média da frequência, latência e duração (\pm E.P.M.) dos comportamentos no campo aberto foi usada uma ANOVA de uma via, com o pós-teste de Newman-Keuls quando

necessário. Para o cálculo estatístico da concentração plasmática de PRL foi usada uma ANOVA de duas vias (grupo analisado e tempo de coleta), com o pós-teste de Newman-Keuls quando necessário. Na interpretação dos resultados, foram consideradas significativas as diferenças com índice de significância de $p \leq 0,05$.



Figura 1 - Procedimento experimental do grupo não manipulado.



Figura 2 - Procedimento de manipulação neonatal por 10 minutos.



Figura 3 - Procedimento experimental do grupo separado.



Figura 4 - Procedimento experimental do grupo estimulado tatilmente, com o auxílio de um pincel.

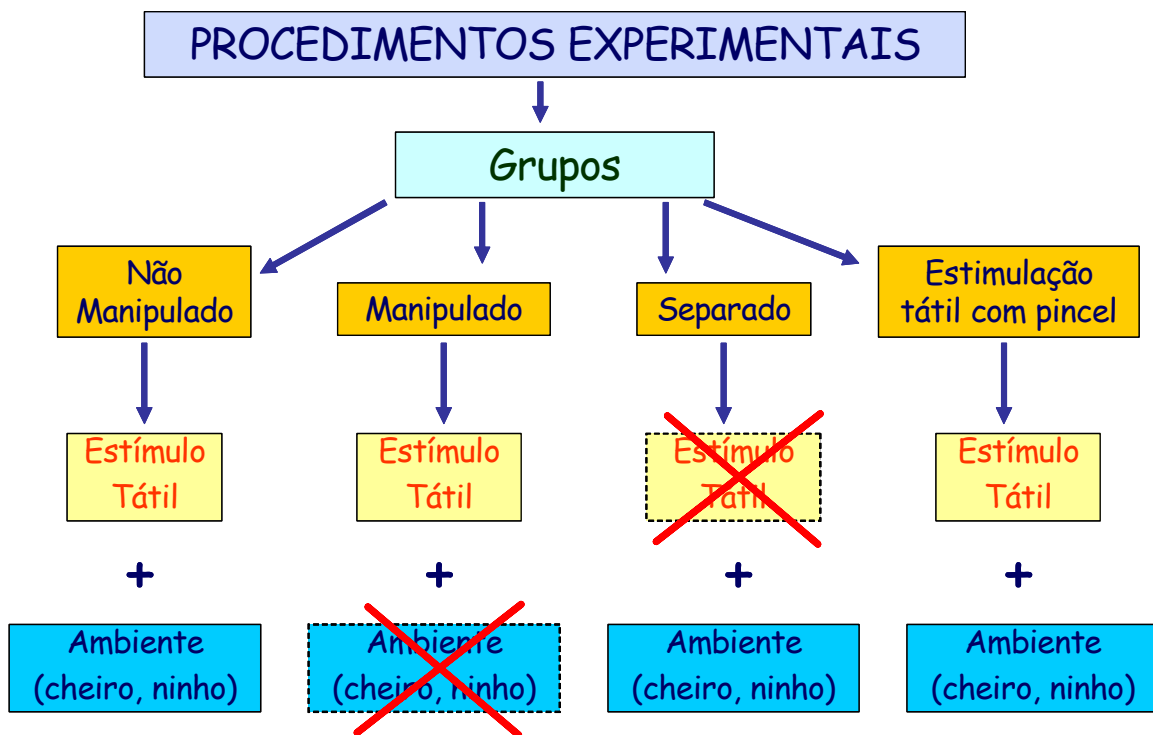


Figura 5 - Resumo esquemático dos grupos experimentais.



Figura 6 - Registro comportamental no campo aberto.

Resultados

RESULTADOS

Registro do comportamento maternal

Para a análise dos resultados do comportamento maternal foi realizada a média de cada rata nos três dias de amostragem, já que não houve diferença entre os dias analisados, e posteriormente foi feita uma média geral para cada grupo.

A figura 7 mostra que não houve diferença significativa na frequência do comportamento de lambe os filhotes entre os quatro grupos [$F_{(3,55)}=1,74$, $p=0,16$]. A figura 8 mostra a duração do comportamento de lambe os filhotes. Pelo teste ANOVA, houve um aumento significativo na duração de lambe os filhotes do grupo manipulado em relação aos grupos não manipulado, separado e estimulação tátil com pincel [$F_{(3,55)}=4,61$, $p=0,005$]. A latência do comportamento de lambe os filhotes (Figura 9) apresenta uma tendência a ser diferente no grupo manipulado em relação aos demais, apesar de não ser estatisticamente diferente [$F_{(3,55)}=2,53$, $p=0,06$].

As figuras 10, 11 e 12 mostram que não houve diferença significativa entre os grupos analisados em relação à frequência,

duração e latência do comportamento de amamentação com o dorso arqueado [$F_{(3,55)}=0,43$, $p=0,73$; $F_{(3,55)}=0,77$, $p=0,51$; $F_{(3,55)}=0,8$, $p=0,5$], respectivamente.

Avaliação da massa corporal

As figuras 13 e 14 mostram que não houve diferença significativa no peso corporal da ninhada aos 11 dias e 21 dias de idade entre os quatro grupos estudados [$F_{(3,44)}=1,17$, $p=0,33$; $F_{(3,44)}=0,07$, $p=0,98$], respectivamente.

Registro comportamental no campo aberto

Em relação ao número de entradas no centro do campo aberto houve tendência de diferença entre os grupos estudados [$F_{(3,55)}=2,46$, $p=0,07$; figura 15]. Por outro lado, a figura 16 mostra que houve um aumento significativo no tempo de permanência no centro do campo aberto entre os grupos manipulado e separado em relação ao não manipulado e estimulação tátil com pincel [$F_{(3,55)}=3,42$, $p=0,02$]. A latência de entradas no centro do campo aberto foi menor [$F_{(3,55)}=5,22$, $p=0,003$] entre os grupos manipulado e separado quando comparados ao grupo não manipulado e estimulação tátil com pincel (Figura 17).

A figura 18 mostra a frequência de locomoção total no campo aberto. Não houve diferença significativa entre os quatro grupos [$F_{(3,55)}=2,21$, $p=0,09$]. Em relação ao tempo de locomoção total (Figura 19) os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si [$F_{(3,55)}=0,74$, $p=0,53$].

A frequência do comportamento de "rearing" não foi estatisticamente diferente entre os grupos não manipulado, manipulado, separado e estimulação tátil com pincel [$F_{(3,55)}=0,92$, $p=0,43$], como mostra a figura 20.

A figura 21 mostra o comportamento de "escanear". Não houve diferença significativa entre os quatro grupos estudados [$F_{(3,55)}=1,34$, $p=0,27$].

Resposta da liberação de Prolactina após estresse por contenção

A figura 22 mostra que não houve diferença significativa para o efeito grupo no basal e após o estresse [$F_{(3,79)}=1,16$, $p=0,33$]. As concentrações de PRL aumentaram após o estresse por contenção em todos os grupos não manipulado, manipulado, separado e estimulação tátil com pincel, após o estresse por contenção [$F_{(3,79)}=14,9$, $p=0,0002$].

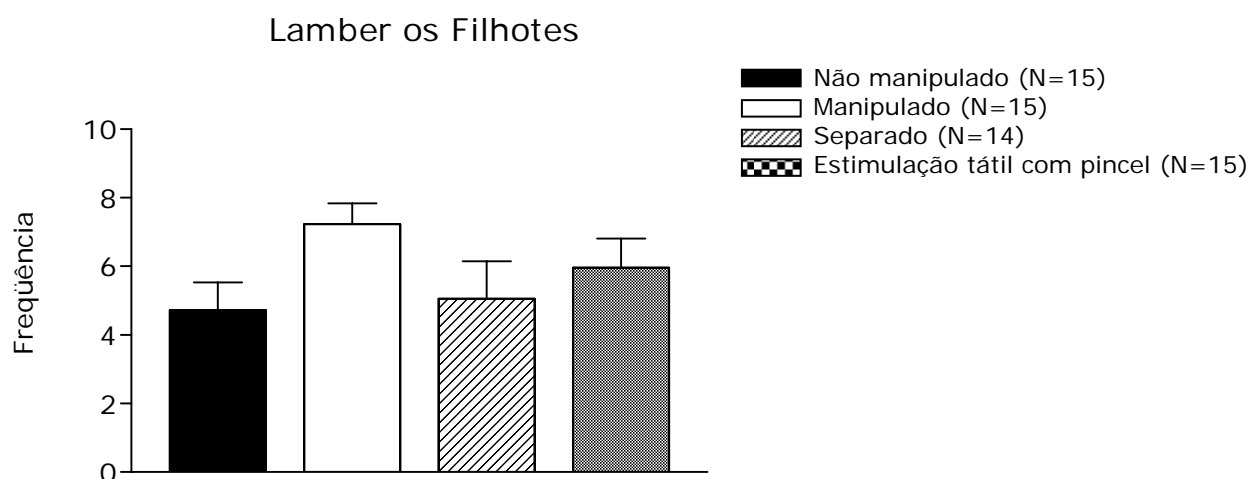


Figura 7 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento de lambar os filhotes de ratas de ninhadas não manipuladas, manipuladas, separadas e estimulação tátil com pincel. Cada rata lactante foi analisada durante 30 minutos, após o procedimento experimental. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses.

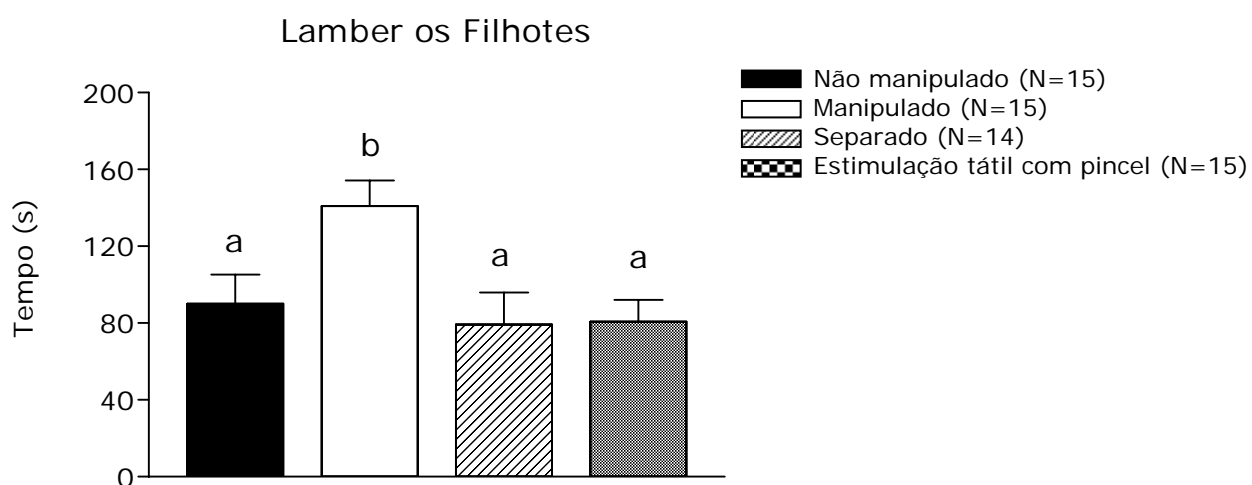


Figura 8 - Média (\pm EPM) da duração do comportamento de lambar os filhotes de ratas de ninhadas não manipuladas, manipuladas, separadas e estimulação tátil com pincel. Cada rata lactante foi analisada durante 30 minutos, após o procedimento experimental. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses. O teste utilizado foi ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste Newman-Keuls. O nível de significância aceito foi de $p \leq 0,05$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas por letras diferentes (**a** e **b**), enquanto letras iguais indicam a ausência desta diferença.

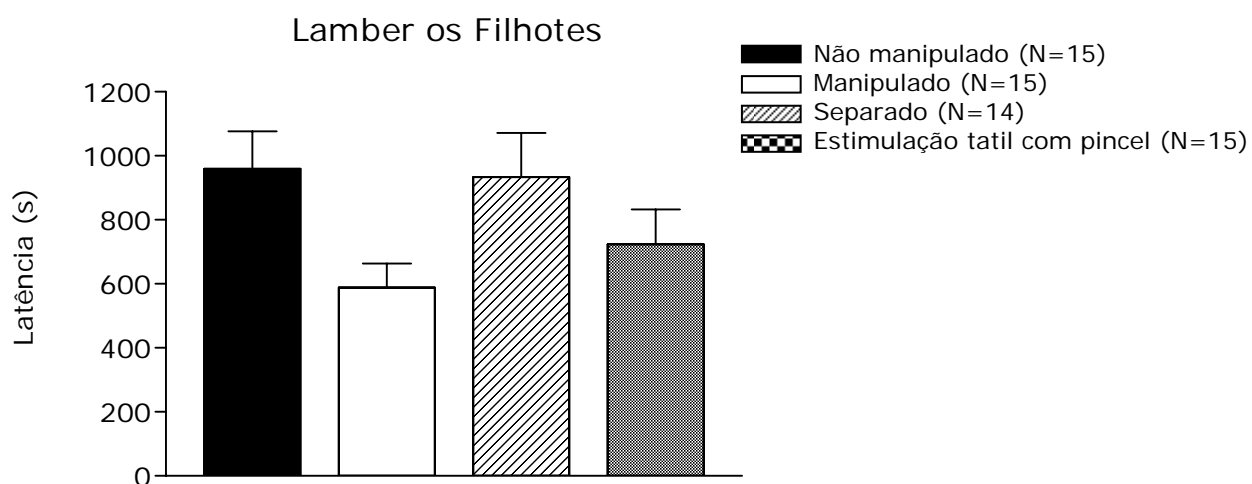


Figura 9 - Média (\pm EPM) da latência do comportamento de lambar os filhotes de ratas de ninhadas não manipuladas, manipuladas, separadas e estimulação tátil com pincel. Cada rata lactante foi analisada durante 30 minutos, após o procedimento experimental. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses.

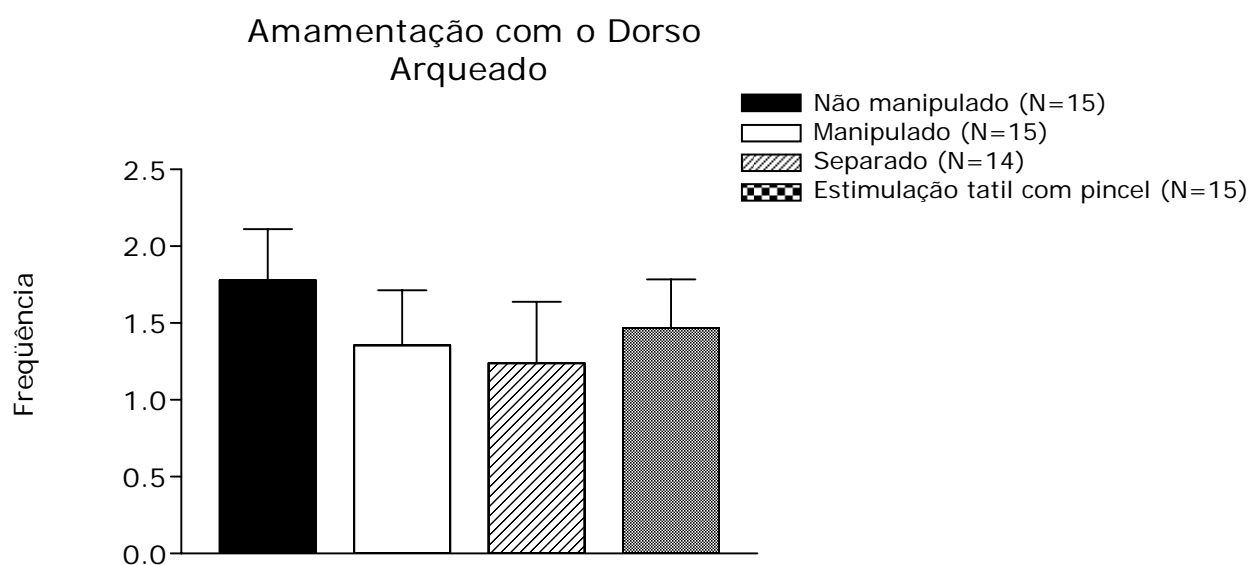


Figura 10 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento de dorso arqueado de ratas de ninhadas não manipuladas, manipuladas, separadas e estimulação tátil com pincel. Cada rata lactante foi analisada durante 30 minutos, após o procedimento experimental. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses.

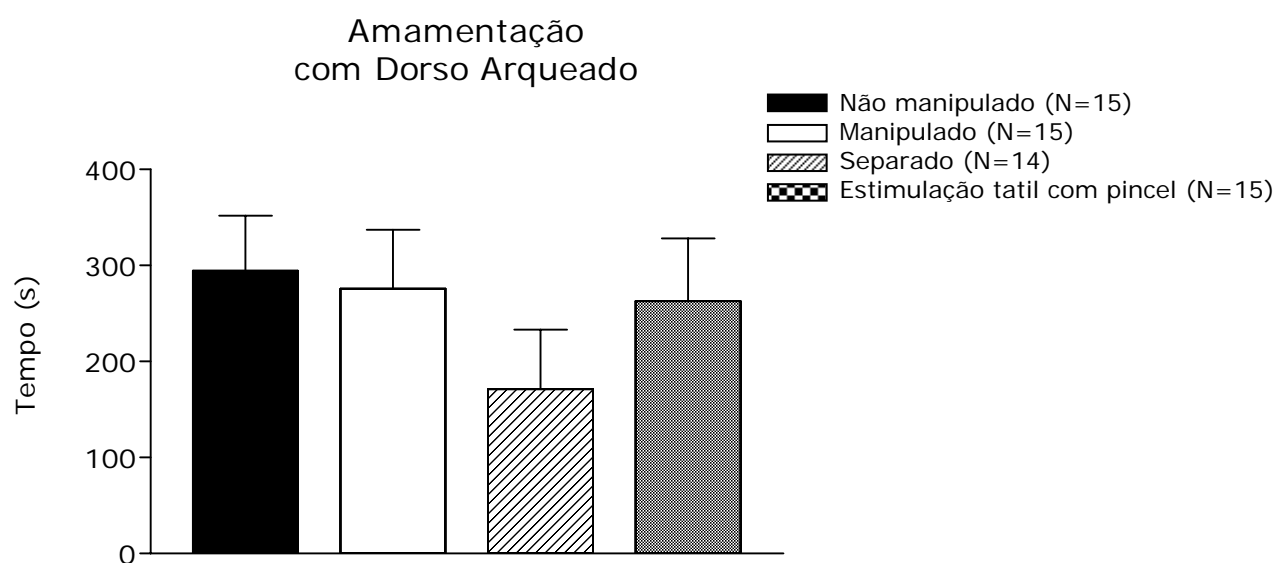


Figura 11 - Média (\pm EPM) da duração do comportamento de dorso arqueado de ratas de ninhadas não manipuladas, manipuladas, separadas e estimulação tátil com pincel. Cada rata lactante foi analisada durante 30 minutos, após o procedimento experimental. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses.

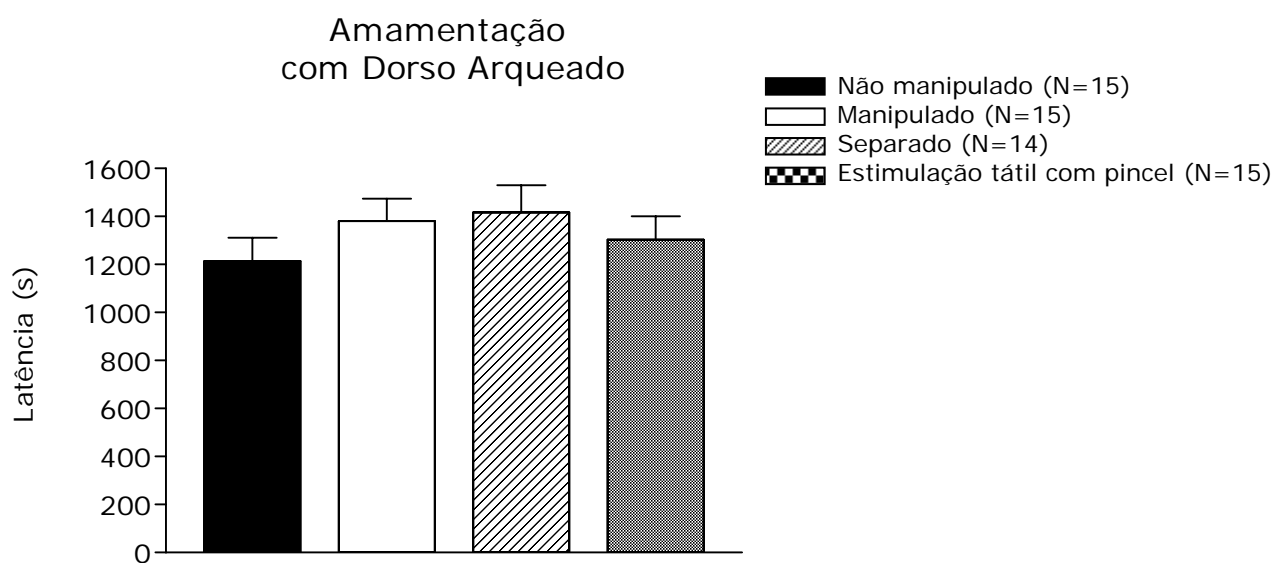


Figura 12 - Média (\pm EPM) da latência do comportamento de dorso arqueado ratas de ninhadas não manipuladas, manipuladas, separadas e estimulação tátil com pincel. Cada rata lactante foi analisada durante 30 minutos, após o procedimento experimental. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses.

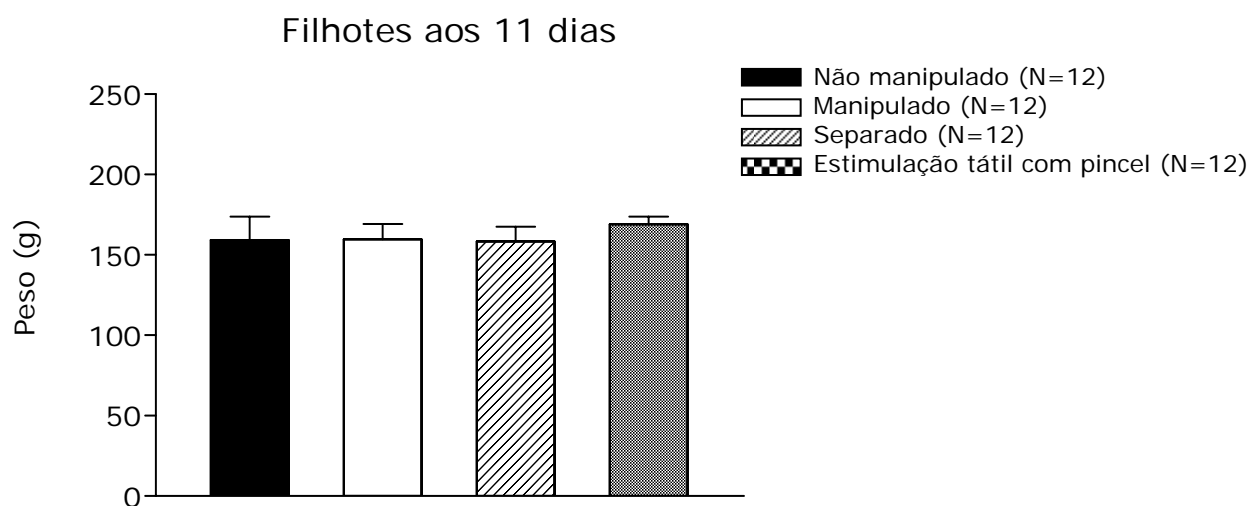


Figura 13 - Média (\pm EPM) da massa corporal (g) das ninhadas aos 11 dias de idade, dos grupos não manipulado, manipulado, separado e estimulação tátil com pincel. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses.

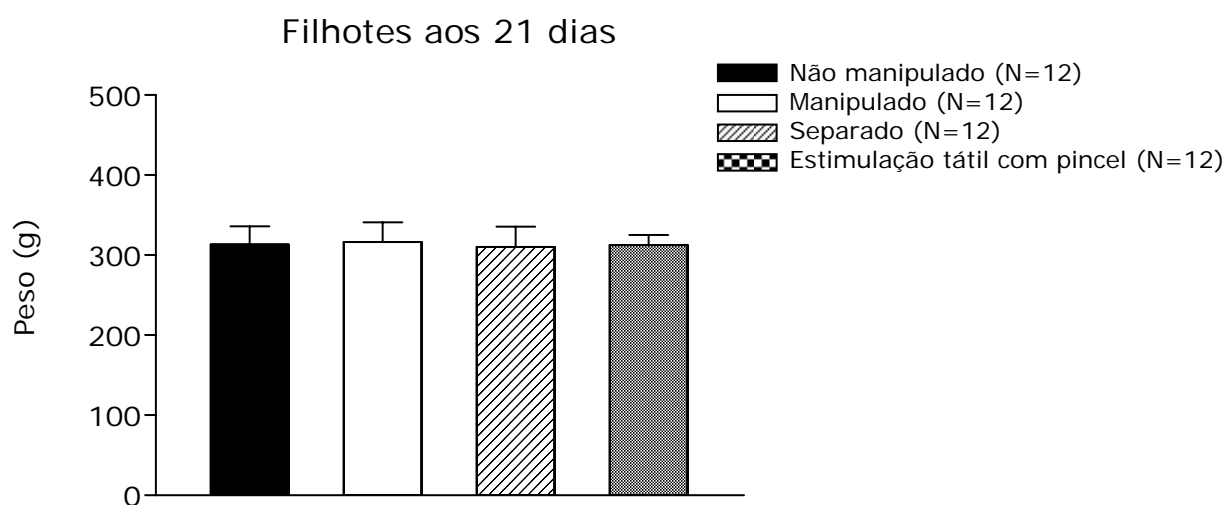


Figura 14 - Média (\pm EPM) da massa corporal (g) das ninhadas aos 21 dias de idade, dos grupos não manipulado, manipulado, separado e estimulação tátil com pincel. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses.

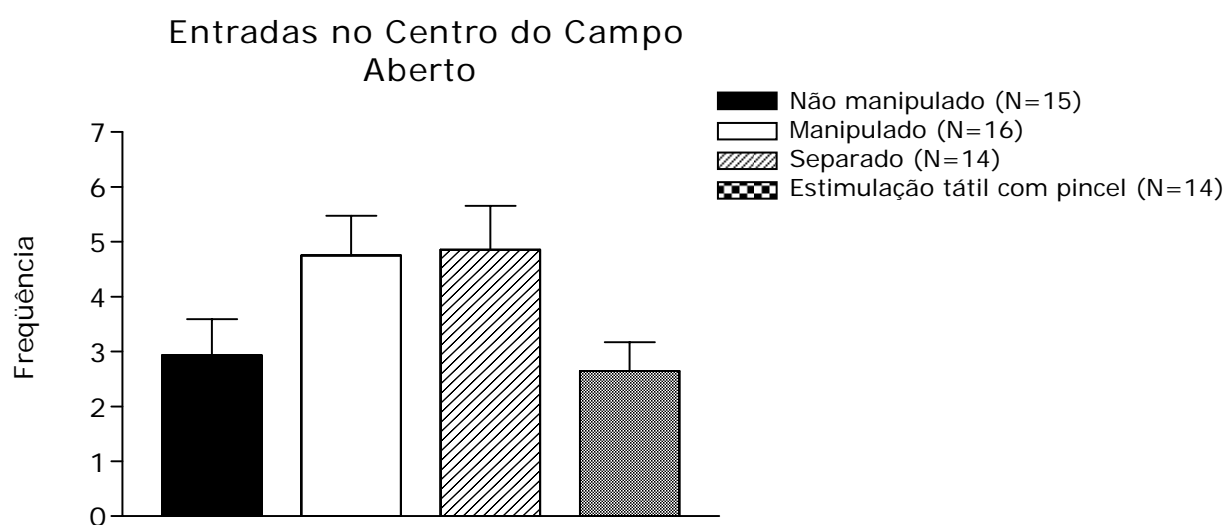


Figura 15 - Média (\pm EPM) da frequência de entradas no centro do campo aberto dos grupos não manipulado, manipulado, separado e estimulação tátil com pincel. Cada animal foi analisado durante 5 minutos. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses.

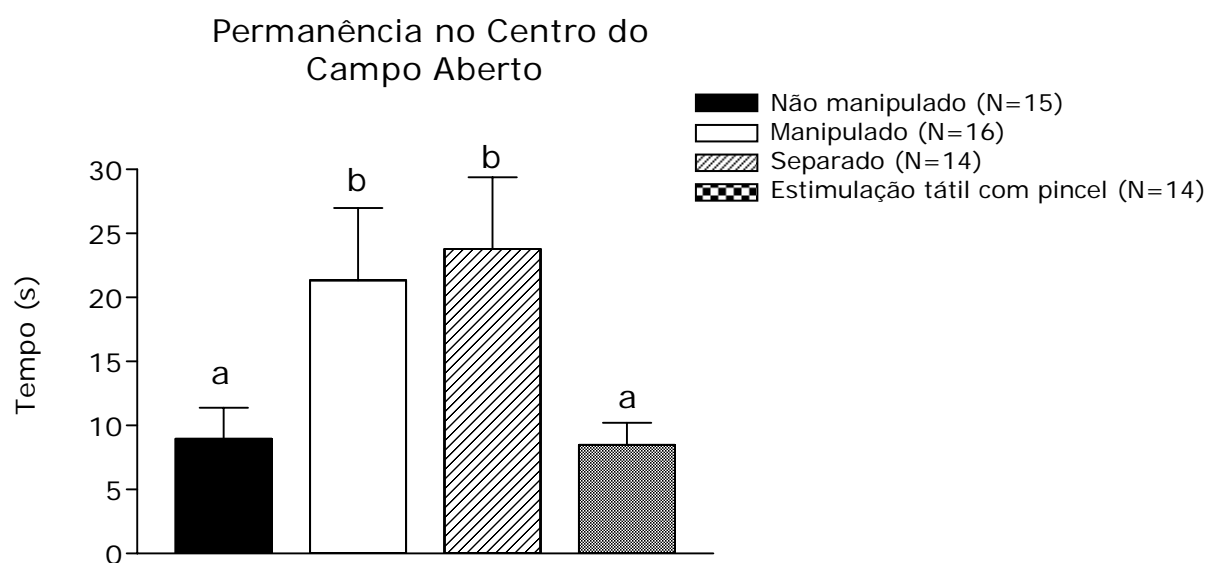


Figura 16 - Média (\pm EPM) do tempo de permanência no centro do campo aberto dos grupos não manipulado, manipulado, separado e estimulação tátil com pincel. Cada animal foi analisado durante 5 minutos. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses. O teste utilizado foi ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste Newman-Keuls. O nível de significância aceito foi de $p \leq 0,05$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas por letras diferentes (**a** e **b**), enquanto letras iguais indicam a ausência desta diferença.

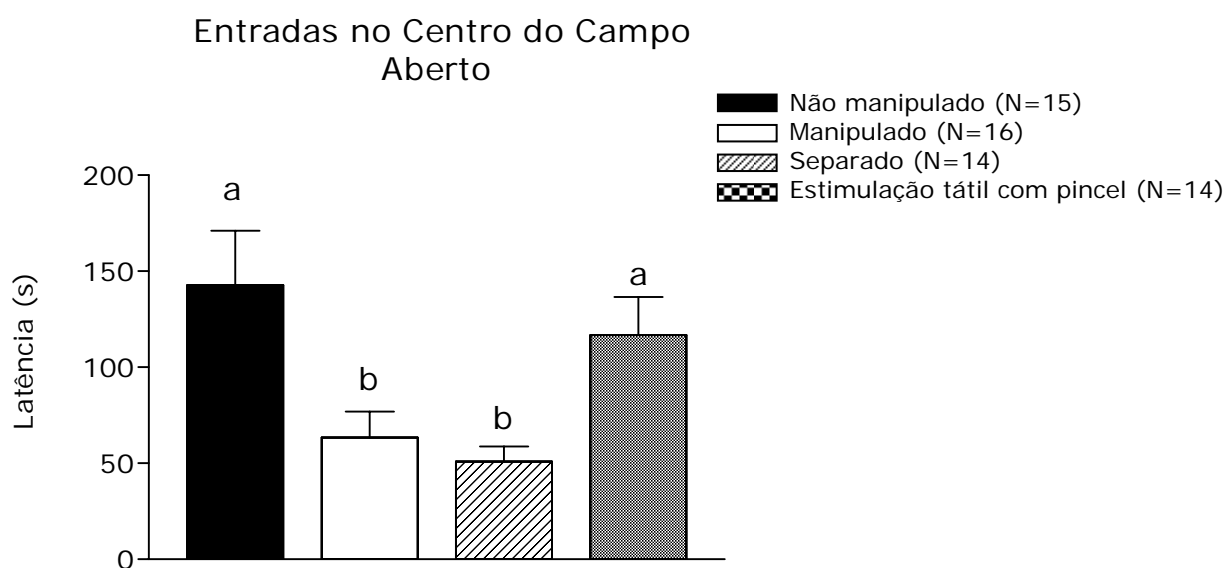


Figura 17 - Média (\pm EPM) da latência de entrada no centro do campo aberto dos grupos não manipulado, manipulado, separado e estimulação tátil com pincel. Cada animal foi analisado durante 5 minutos. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses. O teste utilizado foi ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste Newman-Keuls. O nível de significância aceito foi de $p \leq 0,05$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas por letras diferentes (**a** e **b**), enquanto letras iguais indicam a ausência desta diferença.

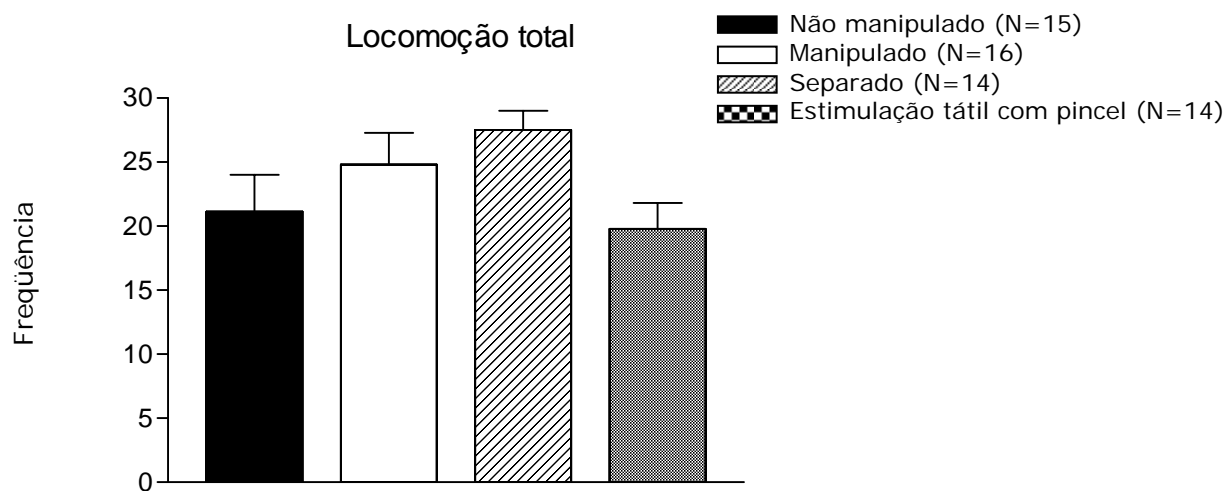


Figura 18 - Média (\pm EPM) da frequência de locomoção total dos grupos não manipulado, manipulado, separado e estimulação tátil com pincel no campo aberto. Cada animal foi analisado durante 5 minutos. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses.

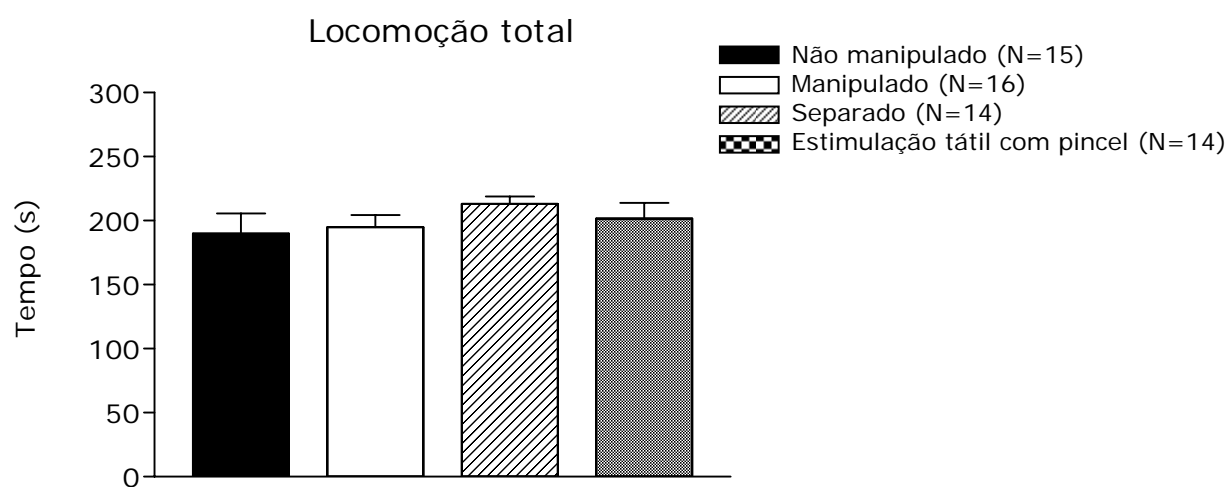


Figura 19 - Média (\pm EPM) da duração de locomoção total no campo aberto dos grupos não manipulado, manipulado, separado e estimulação tátil com pincel. Cada animal foi analisado durante 5 minutos. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses.

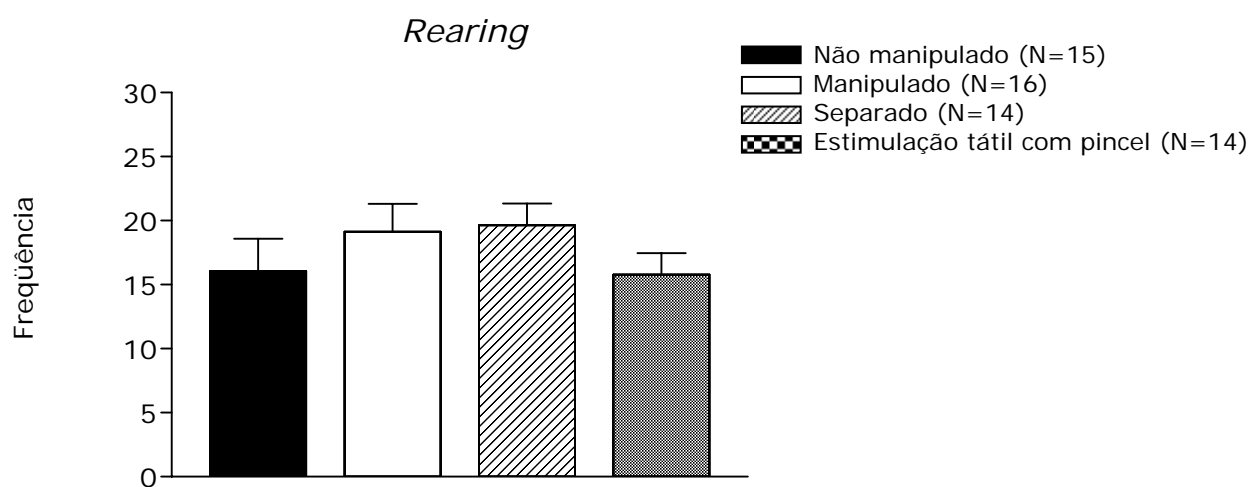


Figura 20 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento de *rearing* dos grupos não manipulado, manipulado, separado e estimulação tátil com pincel, no campo aberto. Cada animal foi analisado durante 5 minutos. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses.

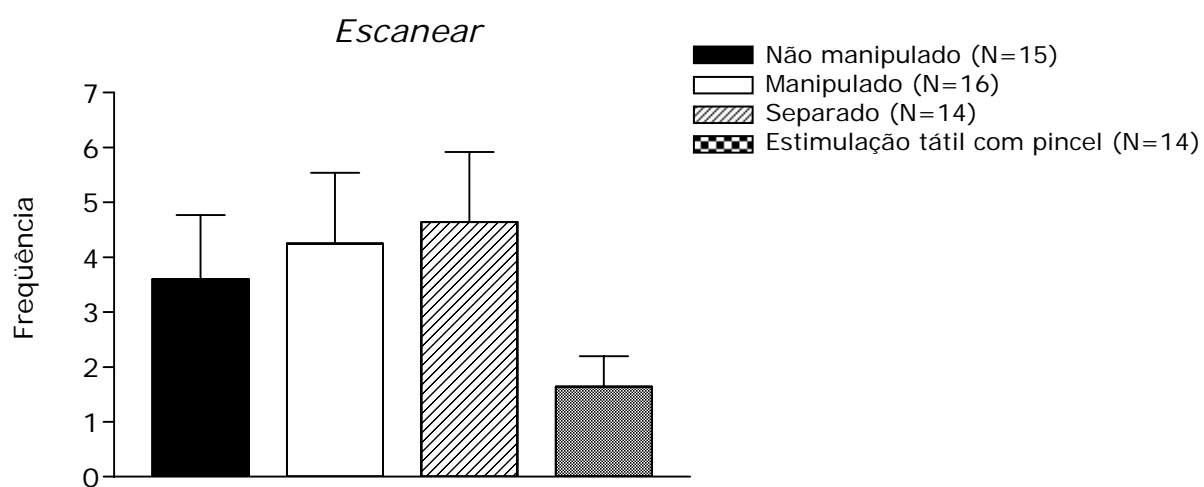


Figura 21 - Média (\pm EPM) da frequência do comportamento de *escanear* dos grupos não manipulado, manipulado, separado e estimulação tátil com pincel, no campo aberto. Cada animal foi analisado durante 5 minutos. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses.

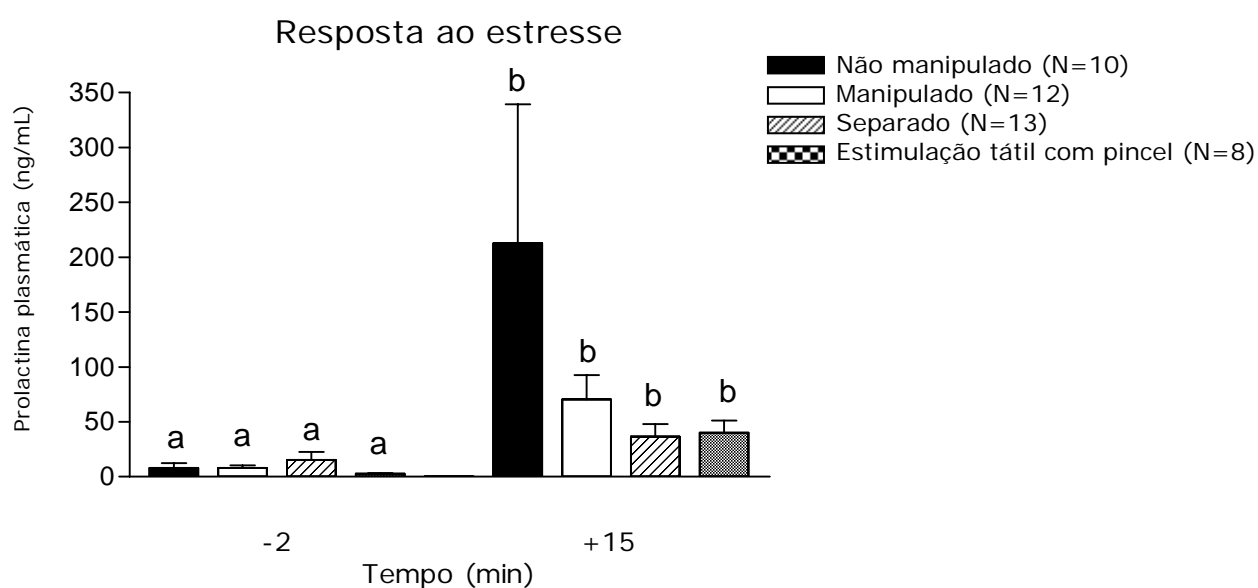


Figura 22 - Média (\pm EPM) das concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) em ratos machos adultos submetidos ao estresse por contenção dos grupos não manipulado, manipulado, separado e estimulação tátil com pincel. A veia jugular foi canulada na tarde anterior ao experimento. O sangue foi coletado na manhã seguinte 2 minutos antes e 15 minutos após o estresse. O número de animais (N) é mostrado entre parênteses. O teste utilizado foi ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste Newman-Keuls. O nível de significância aceito foi de $p \leq 0,05$. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas por letras diferentes (**a** e **b**), enquanto letras iguais indicam a ausência desta diferença.

Discussão

DISCUSSÃO

Estudos realizados nas últimas décadas visam entender quais são os fatores do ambiente neonatal e de que forma estes fatores influenciam nas respostas neuroendócrinas e comportamentais do animal adulto, que sofreu intervenção neste período (Denenberg, 1964; Levine et al., 1967; Hess et al., 1969; Sieck & Ramaley, 1975; Lehmann et al., 1999; Francis et al., 1996; Kalinichev et al., 2002). Diversos trabalhos enfocam a importância da relação mãe-filhote no período neonatal para o desenvolvimento dos filhotes (Anderson & Schanberg, 1975; Pauk et al., 1986). Salientamos que alterações na relação mãe-filhote podem ocorrer naturalmente, devido às diferenças individuais do comportamento maternal em ratos (Liu et al., 2000). Mas, experimentalmente podemos também interferir nesta relação. Diversos estudos propõem que os efeitos da manipulação neonatal são causados pela intervenção na relação mãe-filhote (Liu et al., 1997).

Nosso trabalho visou analisar diferentes intervenções ambientais, através de uma breve separação da mãe (manipulação, separação e estimulação tátil com pincel), que pudessem alterar a relação mãe-filhote. Buscamos entender se as alterações que

ocorrem no animal quando adulto são devidas ao estímulo da mãe, à intervenção neonatal em si ou até mesmo por uma ruptura no convívio do ambiente neonatal. Nossos resultados mostraram uma diferença significativa na duração do comportamento de lambar os filhotes entre o grupo manipulado e os demais. Mães de ninhadas que foram manipuladas no período neonatal apresentaram um aumento na duração do comportamento de lambar os filhotes, quando estes retornaram às caixas-residência após o procedimento experimental.

Os animais que foram manipulados no período neonatal (retirados do seu ninho e estimulados pela mão do experimentador) apresentaram diminuição do medo quando adultos. Entretanto, os animais que foram separados da mãe no período neonatal por 10 minutos, em que a mãe foi retirada da sala e os filhotes permaneceram na caixa-residência sem nenhum estímulo tátil, apenas com o contato e o cheiro do ninho, não apresentaram alterações no comportamento da mãe em relação à prole, porém quando adultos também apresentaram uma diminuição do medo. A partir dos resultados obtidos no presente trabalho sugerimos que o aumento do comportamento da mãe em relação ao filhote não seja o fator preponderante para explicar as alterações comportamentais observadas no animal adulto que sofreu intervenção neonatal.

Em ratos, o principal estímulo tátil nos filhotes é o comportamento de lambar o corpo e a região anogenital dos mesmos pela mãe. Este comportamento é tão importante quanto a amamentação, podendo alterar a plasticidade do sistema nervoso (Van Oers et al., 1998). Esta estimulação da mãe é muito importante, mas devemos considerar também seu toque, seu cheiro e o próprio ninho, como fatores decisivos para o comportamento do filhote na vida adulta. Podemos sustentar esta afirmação a partir dos resultados

obtidos no grupo que foi estimulado tatilmente com o pincel, que permaneceu em seu ambiente e recebeu estímulos que mimetizariam o toque da mãe. Estes animais tiveram respostas comportamentais semelhantes ao grupo não manipulado, que permaneceu na caixa com a mãe sem sofrer nenhuma intervenção durante o período neonatal.

Estudos realizados em nosso laboratório demonstram a importância do ambiente neonatal no desenvolvimento dos filhotes. Mães de ratos manipulados no período neonatal dentro e fora do ninho, ou seja, metade da ninhada foi exposta a um ambiente novo, não apresentam alterações no comportamento em relação aos filhotes. Entretanto, os ratos machos que sofreram esta manipulação fora do ninho, apresentam quando adultos, alterações neuroendócrinas, como uma diminuição nas concentrações plasmáticas de PRL em resposta ao estresse por contenção e alterações comportamentais, como inibição do medo e redução do comportamento sexual, quando comparados aos irmãos manipulados dentro do ninho (Benetti, 2005). Estes resultados, juntamente com os obtidos no presente trabalho, demonstram claramente que além do comportamento maternal (estimulação tátil da mãe) o ambiente neonatal (cheiro e o próprio ninho) são fatores decisivos para o comportamento dos animais na idade adulta.

Liu et al. (2000) demonstraram que ocorrem naturalmente (sem nenhuma intervenção externa) diferenças individuais do comportamento maternal em ratos. Mães mais cuidadosas apresentam um aumento no comportamento de lambar os filhotes e de amamentação com dorso arqueado em relação a mães menos cuidadosas. Os filhotes que recebem mais cuidados de suas mães apresentam, quando adultos, uma maior sinaptogênese hipocampal e

melhor desempenho em atividades de aprendizado, mostrando assim, a importância desta relação.

Outros estudos propõem que os efeitos da manipulação dos filhotes são mediados pelo aumento do comportamento maternal (Liu et al., 1997). Mães cujos filhotes foram manipulados por 15 minutos no período neonatal apresentam um aumento no comportamento de lambar os filhotes e de amamentação com o dorso arqueado quando comparadas a mães com filhotes não manipulados (Liu et al., 1997; Francis et al., 1999a). Nossos resultados estão de acordo com estes estudos no que se refere ao aumento na duração do comportamento de lambar os filhotes manipulados no período neonatal. Porém, não houve alteração no comportamento de amamentação das mães que tiveram seus filhotes sofrendo qualquer tipo de intervenção neonatal. Em experimentos realizados em nosso laboratório observamos também que tanto a manipulação neonatal de 3 minutos, quanto a separação de 180 minutos induzem um aumento do comportamento da mãe de lambar os filhotes, após o retorno dos mesmos ao ninho. Entretanto, estes grupos não apresentaram diferença em relação ao comportamento de amamentação com dorso arqueado (Todeschini, 2002).

Os resultados mostram que a retirada da ninhada da caixa-residência e sua manipulação parece promover na mãe uma resposta comportamental de alteração no cuidado com sua prole, observado pelo aumento da duração de lambar. Esta resposta não ocorre quando separamos a ninhada de sua mãe por 10 minutos, bem como quando realizamos a estimulação tátil com pincel. Nestes dois procedimentos o animal permanece na caixa-residência e a mãe não apresenta alterações no comportamento maternal após o procedimento experimental.

Estudos realizados por Macri et al. (2004) demonstram que mães que tiveram seus filhotes separados por 15 minutos no período neonatal não apresentam alteração no comportamento maternal (lamber e amamentação com o dorso arqueado) em relação ao grupo controle. Porém, observaram que na separação de 3 horas a mãe apresenta aumento do comportamento maternal após o retorno dos filhotes ao ninho. Estes resultados diferem dos encontrados por Liu et al. (1997) que demonstraram um aumento no comportamento de lamber e de amamentação com dorso arqueado da mãe com os filhotes separados por 15 minutos.

Estas divergências nos resultados descritos acima, juntamente com os nossos, poderiam ser explicadas devido à diferença dos protocolos utilizados para separação neonatal. Os filhotes separados no presente trabalho não foram tocados em nenhum momento pelo experimentador, eles permaneceram em sua caixa-residência e suas mães é que foram retiradas do ambiente. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura realiza este procedimento retirando a ninhada da caixa-residência, o que envolve a exposição dos filhotes a um novo ambiente e a ruptura do ninho, além da separação de suas mães. Podemos inferir que a ruptura dos filhotes com o ambiente de convívio, ou seja, a retirada dos mesmos do ninho possa causar um aumento do comportamento maternal, em relação aos grupos controle, pois além da mãe o ambiente também fornece proteção para os filhotes. Apenas o afastamento da mãe do ninho não aumenta o comportamento maternal. Este resultado é previsível, visto que a mãe naturalmente se afasta do ninho para realizar auto-limpeza e para se alimentar, por exemplo, mas permanece na caixa-residência.

Nossos resultados também mostraram que não houve diferença significativa em nenhum parâmetro estudado no comportamento de amamentação com o dorso arqueado das fêmeas, que tiveram suas ninhadas sendo submetidas aos diferentes tipos de intervenção neonatal, o que provavelmente explica o desenvolvimento corporal dos filhotes. Após a realização dos procedimentos experimentais no período neonatal, não houve diferença significativa entre os grupos, no que se refere ao peso das ninhadas tanto aos 11 dias quanto aos 21 dias. Este procedimento foi realizado para verificar se algum tipo de intervenção neonatal afetaria o desenvolvimento dos filhotes. Lehmann et al. (1999) estudou a separação maternal realizada em um único período de 24 horas e demonstrou que os filhotes que sofreram esta separação tiveram uma redução do peso, no 21º dia de vida, quando comparados ao grupo controle. A estimulação tátil com pincel facilita o ganho de peso nos filhotes prematuros (Pauk et al., 1986). Nossos resultados mostram que os diferentes tipos de intervenção ambiental, realizados no período neonatal, não alteraram o desenvolvimento dos filhotes. Estes resultados corroboram com os obtidos no comportamento de amamentação com dorso arqueado, já que não houve alteração no mesmo, indicando uma alimentação padrão entre os quatro grupos no período neonatal.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que os grupos manipulado e separado no período neonatal apresentam, quando adultos, um aumento significativo no tempo de permanência no centro do campo aberto em relação ao não manipulado e ao estimulação tátil com pincel. Este experimento confirma dados já existentes em relação a uma redução do medo em animais manipulados no período neonatal (Padoin et al., 2001). Animais separados por 15 minutos apresentam uma redução das respostas do

eixo HPA ao estresse por contenção e uma redução do medo, permanecendo mais tempo no centro do campo aberto quando comparados aos controles (Macri et al., 2004).

Muitos autores referem-se a este aumento do comportamento de lambe os filhotes como a causa das alterações neuroendócrina e comportamentais no animal adulto que foi manipulado (Champagne et al., 2003), embora o presente trabalho demonstre alterações comportamentais no animal adulto tanto no grupo manipulado quanto no separado, que não sofreu alteração no comportamento maternal.

Em relação ao grupo estimulado tatilmente com o pincel, podemos sugerir que este procedimento amenizou o efeito de separação, já que os filhotes permaneceram na caixa, como no grupo separado, porém sofreram um estímulo que tende a mimetizar o comportamento de lambe da mãe. Podemos salientar novamente a importância do ambiente e do estímulo tátil que os filhotes recebem no período neonatal. Trabalhos demonstraram que o estímulo realizado com o auxílio de um pincel reverte os efeitos da separação maternal (Pauk et al., 1986). Schanberg & Field (1987) demonstram que a separação maternal de 2 horas no período neonatal causa um decréscimo nos níveis de GH plasmático e de ODC no tecido, entretanto a estimulação tátil com o auxílio de um pincel reverte este efeito.

Estudos demonstraram que a atividade do eixo HPA em ratos neonatos também parece depender da relação mãe-filhote, visto que ratos separados por 24 horas no período neonatal apresentam um aumento significativo do ACTH, quando expostos a um ambiente novo ou a uma injeção de salina, quando comparados a ratos que não sofreram nenhuma intervenção (Suchecki et al., 1993).

A concentração plasmática de PRL, assim como a de corticosterona, pode ser considerada uma boa medida de resposta a um estímulo estressor. Estudos realizados por Meerlo e colaboradores (1999) mostram uma menor magnitude de resposta da PRL a ambientes novos (estímulo estressor), em ratos machos que foram manipulados no período neonatal. Severino et al. (2004) demonstraram que as concentrações plasmáticas basais de PRL em ratas adultas não são diferentes entre os grupos controle e manipulado por 1 minuto no período neonatal, tanto em estro quanto em diestro. Entretanto, fêmeas manipuladas no período neonatal apresentam uma menor resposta ao estresse por éter quando adultas na fase de diestro, se comparadas a ratas não manipuladas. González et al. (1990) demonstraram que ratos machos manipulados e estressados cronicamente do 2º ao 15º dia de idade apresentam uma menor liberação de PRL após o nado forçado, entretanto as concentrações basais deste hormônio não foram alteradas.

Outros trabalhos demonstram que a separação neonatal, realizada durante 15 minutos nos 22 primeiros dias de vida, causa na vida adulta uma menor liberação de PRL, em ratos machos após 15 minutos de exposição a um ambiente novo (Núñez et al., 1996). Nossos resultados mostram que não houve diferença nas respostas das concentrações plasmáticas de PRL entre os grupos que sofreram intervenção no período neonatal em relação ao grupo não manipulado, 15 minutos após o estresse por contenção, bem como as concentrações basais de PRL não estão alteradas. Severino et al. (2004) demonstraram que ratos machos manipulados por 1 minuto durante os 10 primeiros dias de vida, não apresentam diferença na concentração plasmática de PRL após serem submetidos ao estresse por éter, quando comparados ao grupo controle. As divergências dos

resultados das concentrações de PRL deste trabalho em relação a dados encontrados na literatura podem ser devido a diferenças nos protocolos. Nossos dados foram obtidos em ratos machos e o estresse utilizado foi contenção, o trabalho realizado por Meerlo e colaboradores (1999) mostra que houve uma redução nas respostas de PRL em ratos manipulados mediante a exposição a um novo ambiente. Nunéz et al. (1996) demonstraram os mesmos resultados para animais separados por 15 minutos no período neonatal, também após a exposição a um ambiente novo. Segundo Freeman et al. (2000) a resposta de secreção da PRL irá depender do tipo de estresse aplicado, estando assim, associada à natureza do estresse, o que pode justificar esta variação nos resultados.

Com os experimentos realizados no presente trabalho podemos concluir que as alterações comportamentais observadas no animal adulto que sofreu manipulação e separação neonatal não podem ser explicadas pelo aumento do comportamento de lambe os filhotes pela mãe. Devemos considerar que este comportamento da mãe é muito importante, mas existem outros fatores que parecem ser decisivos para o desenvolvimento normal do filhote como sua presença (estímulo tátil), seu cheiro e o próprio ninho. Podemos propor que a relação do filhote com os próprios irmãos e a ruptura do ambiente em que ele vive (ninho) contribuem de forma significativa para desencadear as alterações comportamentais observadas na idade adulta, em ratos que sofreram algum tipo de intervenção neonatal.

Conclusões

CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que:

- Apenas o comportamento da mãe (lamber os filhotes) não é um fator que determina as alterações comportamentais observadas no animal quando adulto, que sofreu intervenção neonatal.
- O estímulo tátil que o filhote recebe e o ambiente em que ele vive (ninho) contribuem de forma significativa para desencadear as alterações comportamentais observadas na idade adulta em ratos que sofreram algum tipo de intervenção neonatal.
- A manipulação neonatal foi capaz de aumentar significativamente o comportamento maternal de lamber, mas as outras intervenções (separação, estimulação tátil com pincel) realizadas no período neonatal não alteraram esse comportamento.

- Os machos na idade adulta que foram manipulados e separados no período neonatal apresentam uma redução no medo quando expostos ao campo aberto.
- Os diferentes tipos de intervenção neonatal (manipulação, separação e estimulação tátil com pincel) estudados não afetaram as concentrações plasmáticas de prolactina, quando comparados ao grupo não manipulado, tanto no basal quanto após o estresse por contenção.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C.E.; CADORE, I.P.; PADOIN, M.J.; BARBOSA-COUTINHO, L.M. & LUCION, A.B. Aversive stimulation during the stress-hyporesponsive period does not affect the number of corticotroph cells in neonatal male rats. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research 30**: 1463-1466. 1997.

ALBERT, D.J. & WALSH, M.H. Agression in the lacting female rat: the decline is not dependent on the physical development of the pups. **Physiology and Behavior 58**: 477-481. 1995.

ANDERSON, T.R. & SHANBERG, S.M. Effect of thyroxine and cortisol on brain ornithine decarboxylase activity and swimming behavior in developing rat. **Biochemical and Pharmacology 24**: 495-501. 1975.

ANISMAN, H.; ZAHARIA, M.D.; MEANEY, M.J. & MERALI, Z. Do early life permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? **International Journal of Developmental Neuroscience** **16**: 149-164. 1998.

BENETTI, F. Intervenções na relação mãe-filhote e seus efeitos nas respostas comportamentais e endócrinas na vida adulta. 2005. 93 pg. **Dissertação (Mestrado em Neurociências)**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BEUCHAMP, G.K. & HESS, E.H. Abnormal early rearing and sexual responsiveness in male guinea pigs. **Journal of Comparative and Physiological Psychology** **85**: 383-396. 1973.

BLANCHARD, D.C. & BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Review of Psychology** **39**: 43-68. 1988.

BLANCHARD, D.C., BLANCHARD, R.J., TOM, P. & RODGERS, R.J. Diazepam changes risk assessment in a anxiety/defense test battery. **Psychopharmacology** **101**: 511-518. 1990.

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. **Psychoneuroendocrinology** **26**: 657-672. 2001.

BODNOFF, S.R.; SURANYI-CADOTTE, B.; QUIRION, R. & MEANEY, M.J. Postnatal handling reduces novelty-induced fear and increases [3H] flunitrazepam binding in rat brain. **European Journal Pharmacology 144**: 105-107. 1987.

BOHN, M.C. Granule cell genesis in the hippocampus of rat treated neonatally with hydrocortisone. **Neuroscience 5**: 2003-2012. 1980.

CALDJI, C.; FRANCIS, D.; SHARMA, S.; PLOTSKY, P.M. & MEANEY, M.J. The effects of early rearing environment on development of GABA and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. **Neuropsychopharmacology 22**: 219-229. 2000.

CHAMPGNE, F.A.; FRANCIS, D.D.; MAR, A. & MEANEY, M.J. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology and Behavior 79**: 359-371. 2003.

DE KLOET, E.R.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M.S. & JOELS, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocrine Reviews 9 (3)**:269-301. 1998.

DENENBERG, V.H. Critical periods, stimulus input and emotional reactivity: a theory of infantile stimulation. **Psychological Review 51**: 335-351. 1964.

DENT, G.W.; SMITH, M.A. & LEVINE, S. Rapid induction of corticotropin-releasing hormone gene transcriptio in the paraventricular nucleus of the developing rat. **Endocrinology 141:** 1593-1598. 2000.

FERNANDEZ-TERUEL, A.; ESCHORIHUELA, R.M.; DRISCOLL, P.; TOBENA, A. & BATTIG, K. Infantile (handling) stimulation and behavior in young Roman High and Low-Avoidance rats. **Physiology and Behavior 50:** 563-565. 1991.

FIELD, T. Supplemental stimulation of preterm neonates. **Early Human Development 4:** 301-314. 1980.

FRANCIS, D.D.; DIORIO, J.; LAPLANTE, P.; WEAVER, S.; SECKL, J.R. & MEANEY, M.J. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. **Annals New York Academy of Sciences 794:** 136-152. 1996.

FRANCIS, D.D.; DIORO, J.; LIU, D. & MEANEY, M.J. The role of corticotropin-releasing factor-norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress. **Biological Psychiatry 46:** 1153-1166. 1999.

FRANCIS, D.D. CHAMPAGNE, F.C. LIU, D. & MEANEY, M.J. Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. **Annals New York Academy of Sciences 896:** 66-84. 1999(a).

FREEMAN, M.E.; KANYCSKA, B.; LERANT, A. & NAGY, G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. **Physiological Reviews** **80**: 1523-1631. 2000.

GILAD, V.H.; RABEY, J.M.; ELIYAYEV, Y. & GILAD, G.M. 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** **120**: 255-259. 2000.

GOMES, C.M.; FRANTZ, P.J.; SANVITTO, G.L.; ANCELMO-FRANCI, J.A. & LUCION, A.B. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **32**: 1239-1242. 1999.

GOMES, C.M.; RAINEKI, C.; RAMOS DE PAULA, P.; SEVERINO, G.S.; HELENA C.V.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; FRANCI, C.R.; SANVITTO, G.L. & LUCION, A.B. Neonatal handling and reproductive function in female rats. **Journal of Endocrinology** **184**: 435-445. 2005.

GONZÁLEZ, A.S.; ECHANDIA, E.L.R.; CABRERA, R. & FÓSCOLO, M.R. & FRACCHIA LN. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. I. Effects on forced swim behavior and endocrine responses. **Physiology & Behavior** **47 (4)**:735-41. 1990.

GROTA, L.J. & ADER, R. Continuous recording of maternal behavior in *Rattus norvegicus*. **Animal Behavior** **17**: 722-729. 1969.

GROTA, L.J. & ADER, R. Behavior of lactating rats in a dual chambered maternity cage. **Hormones and Behavior** **5**: 275-282. 1975.

HANDA, R.J.; BURGESS, L.H.; KERR, J.E. & O'KEEFE, J.A. Gonadal steroid hormone receptor and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Hormones and Behavior** **28**: 464-476. 1994.

HARMS, P.G. & OJEDA, S.R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **Journal of Applied Physiology** **36**: 391-392. 1974.

HERMAN, J.P. & CULLINAN, W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hipotalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in neurosciences** **20**: 78-84. 1997.

HESS, J.; DENENBERG, V.H., ZARROW, M.X. & PFEIFER, W.D. Modification of the corticosterone response curve as a function of handling in infancy. **Physiology and Behavior** **4**: 109-111. 1969.

HUOT, R.L.; THRIVIKRAMAN, K.V.; MEANEY, M.J. & PLOTSKY, P.M. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in long evans rats and reversal with antidepressant treatment. **Psychopharmacology** **158**: 366-373. 2001.

IWASAKI, S.; INOUE, K.; KIRIIKE, N. & HIKIJI, K. Effect on maternal separation on feeding behavior of rats in later life. **Physiology & Behavior 30**: 551-556. 2000.

JANS, J.E & LEON, M. Determinants of mother Young contact in norway rats. **Physiology and Behavior 30**: 919-935. 1983 (a).

KALINICHEV, M.; EASTERLING, K.W.; PLOTSKY, P.M. & HOLTZMAN, S.G. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior 73**: 131-140. 2002.

KENDRICK, K.M.; HINTON, M.R.; ATKINS, K.; HAUPT, M.A. & SKINNER, J.D. Mothers determine sexual preferences. **Nature 395**: 229-230. 1998.

KONSTANDI, M.; JOHNASON, E.; LANG, M.; MALAMAS, M. & MARSELOS, M. Noradrenaline, dopamine, serotonin: different effects of psychological stress on brain biogenic amines in mice and rats. **Pharmacological Research 41**: 341-346. 2000.

KOPIN, I.L. Definitions of stress and symphetic neural responses. **Annual New York Academy of sciences 771**: 19-30. 1995.

KUHN, C.M.; BUTLER, S.R. & SHANBERG, S.M. Selective depression of serum growth hormone during maternal deprivation in rat pups. **Science 201**:1034-1036. 1978.

LEENGOED, E.; KERKER, E. & SWANSON, H.H. Inhibition of postpartum maternal behavior in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. **Journal of Endocrinology** **112**: 275-282. 1987.

LEHMANN, J.; PRYCE, C.R.; BETTSCHEN, D. & FELDON, J. The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** **64 (4)**: 705-715. 1999.

LEON, M. & MOLTZ, H. Maternal Pheromone: discrimination by preweaning albino rats. **Physiology and Behavior** **7**: 265-267. 1971.

LEON, M.. Maternal Pheromone. **Physiology and Behavior** **13**: 441-453. 1974

LEVINE, R.; HALTMEYER, G.C.; KARAS, G.G. & DENENBERG, V.H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. **Physiology and Behavior** **2**: 55-59. 1967.

LEVINE, S. The psychoendocrinology of stress. **Annals of the New York Academy of Sciences** **697**: 61-69. 1993.

LEVINE, S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. **Annual New York Academy of Sciences** **746**: 275-293. 1994.

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

LIU, D.; DIORIO, J.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C., FRANCIS, D., FREEDMAN, A., SHARMA, S., PEARSON, D., PLOTSKY, P.M. & MEANEY, M.J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. **Science** **277**: 1659-1662. 1997.

LIU, D.; CALDJI, C.; PLOTSKY, P.M. & MEANEY, M.J. Influences of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Journal of Neuroendocrinology** **12**: 5-12. 2000.

LUCION, A.B., CHARCHAT, H. PEREIRA, G.A.M. & RASIA-FILHO, A.A. Influence of early postnatal gonadal hormones on anxiety in adult male rats. **Physiology and Behavior** **60**: 1419-1423. 1996.

LUCION, A.B., PADOIN, M.J.; PEREIRA, F.M.; MANDARIN-LACERDA, C.A. & SCHNEIDER, F.L. Estimation of the number of neurons in the medial amygdala and frontal cortex of rats submitted to neonatal stimulation. **29th Annual Meeting of the Society for Neuroscience**. p. 617. 1999.

LUCION, A.B.; PEREIRA, F.M.; WINKELMAN, E.C.; SANVITTO, G.L. & ANSELMO-FRANCI J.A. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. **Behavior Neuroscience** **117 (5)**: 894-903. 2003.

MACRI, S.; MASON, G.J. & WURBEL, H. Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. **European Journal of Neuroscience** **20**: 1017-1024. 2004.

MATHEWS, K.; WILKINSON, L.S. & ROBBINS, T.W. Repeated maternal separation of preweanling rats attenuates behavioral responses to primary and conditioned incentives in adulthood. **Physiology and Behavior** **59 (1)**: 99-107. 1996.

MEANEY, M.J.; 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. **Annals of New York Academy of Sciences** **697**: 70-85. 1993.

MEANEY, M.J.; DIORIO, J.; WIDDOWSON, J.; LAPLANTE, P.; CALDJI, C.; EEKL, J.R. & PLOTSKY, P.M. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. **Developmental Neuroscience** **18**: 49-72. 1996.

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 11**: 925-933. 1999.

MELIA, K.R. & DUMAN, R.S. Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88**: 8382-8386. 1991.

MOORE, C.L. Sex differences in urinary odors produced by young laboratory rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology 99**: 336-341. 1985.

MOORE, C.L. The role of maternal stimulation in the development of sexual behavior and its neural basis. **Annals New York Academy of Sciences 662**: 160-177. 1992.

NUMAN, M. Maternal Behavior. p. 221-302. **In.**: KNOBIL E & NEILL J. D. (ed.). **The physiology of reproduction**. Raven Press (New York). 1994.

NÚÑEZ, J.F.; FERRÉ, P.; ESCORIHUELA, M.; TOBEÑA, A. & FÉRNANDEZ-TERUEL, A. Effects of postnatal handling of rats on emotional, HPA-axis, and prolactin reativity to novelty and conflict. **Physiology and Behavior 60 (5)**: 1355-1359. 1996.

PADOIN, M.J.; CADORE, L.P.; GOMES, C.M.; BARROS, H.T.M. & LUCION, A.B. Long-Lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. **Behavioral Neuroscience** **115 (6)**: 1332-1340. 2001.

PAUK, J.; KHUN, C.M.; FIELD, T.M.; SHAMBERG, S.M. Positive effects of tactile versus kinesthetic or vestibular stimulation on neuroendocrine and ODC activity in maternally-deprived rat pups. **Pergamon Journals** **39**: 2081-2878. 1986.

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** **18**: 195–200. 1993.

POLAN, H.J. & HOFER, M.A. Maternal directed orienting behaviors of newborn rats. **Developmental psychobiology** **34**: 269-279. 1999.

REEHS, R.W., LEPHART, E.D. & ELIASON, D. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproduction function. **Behavior Brain Research** **123**: 1-10. 2001.

REISBICK, S.; ROSENBLATT, J.S. & MAYER, A.D. Decline of maternal behavior in the virgin and lactating rat. **Journal of Comparative Physiological Psychology** **89**: 722-732. 1975.

SAPOLSKY, R.M. & MEANEY, M.J. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and stress hyporesponsive period. **Brain Research Review 11**: 65-76. 1986.

SCOTT, J.P. Critical periods in behavioral development. **Science 138**: 949-958. 1962.

SCHANBERG, S.M. & KUHN, C.M. Enzymes and Neurotransmitters in Mental Disease. p.373-393. **In.**: USDIN, E.; SOURKES, T.L. & YODIM, M.B.H.. (ed.). **John Wiley and Sons, Ltd.** (New York). 1980.

SCHANBERG, S.M.; EVONIUK, G. & KUHN, C.M. Tactile and nutritional aspects of maternal care: specific regulators of neuroendocrine function and cellular development. **Proc Soc Exp Biol Med 175**: 135-146. 1984.

SCHANBERG, S.M. & FIELD, T.M. Sensory deprivation stress and supplemental stimulation in the rat pup and preterm human neonate. **Child Development 58**: 1431-1447. 1987

SCHANBERG, S.M. & KUHN, C.M. The biochemical effects of tactile deprivation in neonatal rats. **Perspectives on Behavioral Medicine 2**: 133-148. 1995.

SEVERINO, G.S.; FOSSATI, I.A.; PADOIN, M.J.; GOMES, C.M.; TREVIZAN, L.; SANVITTO, G.L.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. & LUCION A.B. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. **Physiology & Behavior** **81 (3)**: 489-98. 2004.

SIECK, G. & RAMALEY, J.A. Effects on early handling upon puberty: correlations with adrenal stress responsiveness. **Physiology and Behavior** **15**: 487-489. 1975.

SMITH, M.A.; KIM, S.Y.; VAN OERS, H.J.J. & LEVINE, S. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. **Endocrinology** **138**: 4622-4628. 1997.

STERN, J.M. & JOHNSON, S.K. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. **Physiology and Behavior** **47**: 993-1011. 1990.

SUCHECKI, D.; MOZZAFARIAN, D.; GROSS, G.; ROSENFELD, P. & LEVINE, S. Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the rat infant. **Neuroendocrinology** **57**: 204-212. 1993.

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.

VAN OERS, H.J.J.; DE KLOET, E.R.; LEVINE, S. Persistent effects of maternal deprivation of HPA regulation can be reversed by feeding and stroking, but not by dexamethasone. **Journal of Neuroendocrinology 11**: 581-588. 1999.

VILLESCAS, R.; BELL, R.W.; WRIGHT, L. & KUFNER, M. Effect of handling on maternal behavior following return of pups to the nest. **Developmental Psychobiology 10**: 323-329. 1977.

WAKABAYASHI, I.; ARIMURA, A. & SCHALLY, A.V. Effect of pentobarbital and ether stress on serum prolactin levels in rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 137**: 1193-1198. 1971.

WIGGER, A. & NEUMANN, I.D. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavior and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. **Physiology and Behavior 66 (2)**: 293-302. 1999.

WILSON, J.H.; MCKINLEY, S.A. & YOUNG, B.L. Prolactin levels in juvenile and adult rats following acute restraint and the open field. **Physiology and Behavior 68**: 383-387. 2000.