



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia.

INTERVENÇÕES NA RELAÇÃO MÃE-FILHOTE E SEUS EFEITOS NAS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E ENDÓCRINAS NA VIDA ADULTA

FERNANDO BENETTI

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.

INTERVENÇÕES NA RELAÇÃO MÃE-FILHOTE E SEUS EFEITOS NAS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E ENDÓCRINAS NA VIDA ADULTA

Dissertação apresentada ao curso de
Pós- Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia, da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, sob orientação do Prof. Dr.
Aldo Bolten Lucion, como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em
Fisiologia.

FERNANDO BENETTI

Porto Alegre, RS

2005

*" Há um dom acima de todos os outros que torna o homem
único entre os animais [...]
o imenso prazer em exercer e aprimorar suas habilidades.
A descoberta é uma dupla reação de análise e síntese juntas.
Como análise, ela sonda a procura do que existe [...]
Como síntese, une as partes de maneira que a mente criativa trama
o esqueleto simples fornecido pela natureza."*

Jacob Bronowski

The Ascendent of Men (1973)

*Dedico este trabalho às pessoas que amam e sabem compreender
as mais diferentes formas de se expressar o amor.*

*Também dedico este trabalho às pessoas
que humildemente se importam em ensinar,
pois são essas pessoas que se dedicando ao aprendizado dos outros,
compartilham suas experiências sem cobrar nada em troca.*

Isto também é amor...

"Aos meus pais, por tudo ..."

Agradecimentos

Aos meus pais **Claudir e Elizabete** e ao meu irmão **Ricardo** primeiramente por sermos uma família e pela importância da nossa união. Apesar da ausência física sempre me incentivaram nos momentos de dificuldades.

A **Deus** com sua infinita sabedoria, por escolher o inferno no meio do paraíso para que nós sempre ficássemos atentos. E também por me mostrar ser grande e forte nos momentos de dificuldades e de solidão no início do mestrado.

Ao prof. Dr. **Gilberto Sanvito** pela colaboração na minha formação, pelo incentivo e amizade.

A **Jú** por me aceitar na sua vida mesmo à distância.

Ao prof. Dr. **Celso Rodrigues Franci**, pelo auxílio fundamental nas dosagens hormonais.

Aos colegas de laboratório **Márcia K. Breijeiron, Elisa Cristina Winkelmann-Duarte, Isabel Fossati, Anelise Todeschini, Márcio Donadio, Márcia Azevedo, Natalia Uriarte, Gabriela Severino, Cármen Marilei Gomes, Tatiane Cagol, Caroline Perinazzo da Veiga** que contribuíram com a amizade e coleguismo nas mais diversas e importantes situações.

A **Ana Lúcia Cecconello**, pela amizade e companheirismo acima de tudo e pelos almoços de domingo em sua aconchegante casa.

Ao **Charlis Rainecki**, pela amizade, e principalmente pela enriquecedora convivência no laboratório e pelo auxílio prestado na redação deste trabalho.

Ao **Paulo Andrade de Araújo** pela dedicação em todos os experimentos realizados e pela motivação na iniciação científica.

À **Sônia A. Zanon**, pelas dosagens hormonais.

À **Ângela** nossa bioterista, pela dedicação, atenção e grande cuidado com os animais.

Ao prof. Dr. **Aldo Bolten Lucion**, pela oportunidade, e atenção que tiveste na orientação desta dissertação. Tenho respeito e admiração ao seu trabalho.

Ao **biotério central da UFRGS**, pelo fornecimento dos animais.

Às secretárias da Pós-graduação **Uíra, Alice e Fabiana** pela simpatia e por estarem sempre atentas às obrigações dos alunos da pós-graduação.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de mestrado.

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

Sumário

Lista de figuras.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	x
Resumo.....	xi
INTRODUÇÃO.....	13
Resposta ao estresse.....	13
Período hiporresponsivo ao estresse.....	14
Estimulação neonatal.....	15
Separação maternal.....	18
Comportamento maternal e a relação mãe-filhote.....	20
JUSTIFICATIVA.....	27
OBJETIVOS.....	28
MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
Animais.....	29
Intervenções na relação mãe-filhote no período neonatal.....	29
Protocolos experimentais.....	32
Comportamento maternal.....	32
Campo aberto.....	33
Comportamento sexual.....	35
Indução da receptividade sexual.....	36
COMPORTAMENTO DE MEMÓRIA SOCIAL.....	38
Reatividade ao estresse de contenção.....	40
Canulação da veia jugular.....	40
Coletas de sangue.....	40
Dosagem hormonal.....	41

ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
RESULTADOS.....	44
Comportamento maternal.....	45
Comportamento dos ratos machos no campo aberto.....	47
Comportamento sexual dos ratos machos adultos.....	50
Comportamento de memória social.....	54
DISCUSSÃO.....	64
CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

Lista de figuras

Figura 1. Ilustração do desenho experimental das intervenções na relação mãe-filhote.....	31
Figura 2. Procedimento do registro do comportamento maternal.....	33
Figura 3. Campo aberto.....	34
Figura 4. Ilustração do protocolo para o registro do comportamento no campo aberto.....	35
Figura 5. Ilustração do protocolo para o registro do comportamento sexual dos machos.....	37
Figura 6. Comportamento sexual de machos.....	37
Figura 7. Ilustração do protocolo para o registro do comportamento de reconhecimento e interação social de machos adultos expostos ao intruso juvenil.....	39
Figura 8. Ilustração do protocolo para a coleta de sangue de machos adultos durante o estresse por contenção.....	41
Figura 9. Comportamento maternal de lambe os filhotes nos dia 1, 5 e 10 pós-parto.....	46
Figura 10. Latência, frequência e a duração de ir ao centro do campo aberto....	48
Figura 11. Frequência e duração da locomoção total no campo aberto.....	49
Figura 12. Comportamento de cheirar os genitais da fêmea receptiva.....	51
Figura 13. Comportamento de montar a fêmea receptiva.....	52
Figura 14. Latência de ejaculação e período refratário do comportamento sexual de ratos machos.....	53
Figura 15. Frequência e duração de cheirar o intruso juvenil (machos sem experiência sexual prévia).....	57
Figura 16. Frequência e duração de perseguir o intruso juvenil (machos sem experiência sexual prévia).....	58
Figura 17. Frequência e duração de cheirar o intruso juvenil (machos com experiência sexual prévia).....	59
Figura 18. Frequência e duração de perseguir o intruso juvenil (machos com experiência sexual prévia).....	60

Figura 19. Efeito do estresse de contenção em ratos machos adultos sobre a concentração plasmática de prolactina.....	62
Figura 20. Área abaixo da curva da concentração plasmática de prolactina.....	63

Lista de Abreviaturas

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico
AVP – Arginina vasopressina
DNA – Ácido desoxirribonucléico
CORT – Corticosterona
CRH – Hormônio liberador de corticotrofina
FSH – Hormônio folículo estimulante
HPA – Eixo hipotálamo-hipófise
GH – Hormônio de crescimento
LC – Locus coeruleus
LH – Hormônio luteinizante
LHRH – Hormônio liberador do hormônio luteinizante
MN – Manipulado no ninho
MF – Manipulado fora do ninho
ODC – Ornitina decarboxilase
OVX - Ovariectomizada
NA – Noradrenalina
PRL – Prolactina
PVN – Núcleo paraventricular do hipotálamo
RIA – Radioimunoensaio
SNC – Sistema nervoso central
TSH – Hormônio tireoestimulante

Resumo

Intervenções na relação mãe-filhote como a manipulação neonatal e a exposição dos animais a um novo ambiente promovem alterações comportamentais, neuroendócrinas e estruturais estáveis na vida do animal adulto. Em ratos a manipulação neonatal e a exposição dos filhotes a um novo ambiente geralmente nas duas primeiras semanas de vida do animal, no período hiporresponsivo ao estresse têm um importante papel no desenvolvimento do animal, pois é nesta fase que as primeiras relações sociais são formadas e o organismo está sensível aos diferentes estímulos e as modificações do ambiente.

Neste trabalho metade dos filhotes de cada ninhada foram manipulados no ninho (MN) e a outra metade dos filhotes foi manipulada fora do ninho (MF) em um novo ambiente que representa um ninho novo construído com maravalha limpa. Todos os filhotes foram tocados pelo experimentador por 3 minutos diários nas duas primeiras semanas de vida. Este procedimento permitiu-nos testar a hipótese de que o aumento no comportamento maternal como consequência da manipulação neonatal dos filhotes no ninho e fora do ninho induz às alterações comportamentais classicamente estudadas nos ratos adultos.

Nossos resultados mostram que a exposição dos filhotes ao novo ambiente não altera o comportamento maternal entre os filhotes irmãos, mas provoca uma menor inibição comportamental em machos no campo aberto, e diminui o comportamento sexual em machos. Os machos MN e MF foram capazes de reconhecer a presença de diferentes intrusos quando testados no comportamento de memória social, no entanto, os irmãos MF mostraram uma menor reatividade ao estresse quando comparados aos irmãos que permaneceram no ninho, pois a concentração plasmática de prolactina foi menor nestes animais quando mantidos em estresse por contenção.

Portanto, a mãe representa um componente primordial no desenvolvimento dos filhotes, porém não é o único. As alterações comportamentais resultantes da exposição ao novo ambiente no período neonatal aparentemente independem da estimulação táctil dos filhotes indicando que o ninho parece fornecer uma proteção importante contra possíveis alterações comportamentais nos animais adultos.

INTRODUÇÃO

Respostas ao estresse

Os organismos, quando expostos a situações de ameaça e perigo, respondem com uma série de respostas adaptativas, físicas e mentais que se opõe aos estímulos estressores na tentativa de manter a homeostasia (CHROUSOS et al., 1992; BATERSON et al., 2004).

Os principais componentes destas respostas adaptativas são o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o sistema autonômico simpático através da noradrenalina (NA) (CHROUSOS et al., 1992; De VRIES et al., 2003; CHARMANDARI et al., 2005).

Quando o organismo está submetido a uma situação estressante, a resposta do eixo (HPA) se faz através dos neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo que sintetizam e secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina-vasopressina (AVP), que ao atuarem na hipófise anterior, promovem a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e este por sua vez, estimula a secreção de glicocorticóides pelo córtex da adrenal (FRANCIS et al., 1996; TSIGOS & CHROUSOS, 2002). Além disso, o estresse induz a ativação do sistema autônomo simpático promovendo a descarga periférica de noradrenalina nos terminais sinápticos e pela camada medular da adrenal, importante para o organismo prover substratos energéticos durante o estresse (KOPIN, 1995) através da ativação da lipólise, gliconeogênese e catabolismo de proteínas junto com os glicocorticóides circulantes.

O estresse induz a secreção de NA em todo o cérebro sendo que grande parte desta noradrenalina central secretada em resposta ao estresse origina-se no Locus Coeruleus (LC), que é extremamente sensível à maioria dos estímulos estressantes (MELIA & DUMAN, 1991; TSIGOS & CHROUSOS, 2002) e é um importante modulador do eixo HPA.

Além da secreção de NA e ACTH, a maioria das situações de estresse induz a secreção conjunta de um hormônio que responde prontamente aos estímulos estressantes, a prolactina (PRL). Assim, a PRL pode ser considerada juntamente com o ACTH, como um bom índice quantitativo das respostas ao estresse (ARMARIO et al., 1986).

Período hiporresponsivo ao estresse

O período hiporresponsivo ao estresse no rato ocorre nas duas primeiras semanas de vida, e é marcado por uma redução na capacidade de secretar ACTH e corticosterona em resposta ao estímulo estressor (WALKER et al., 1993; PARK et al., 2003; SCHMIDT et al., 2004).

A inabilidade para sintetizar e estocar ACTH e a imaturidade dos sistemas de receptores de CRH representa uma possibilidade considerada por WALKER et al (1986), de que a pituitária neonatal seja incapaz de responder a liberação de CRH via sistema porta hipotalâmico hipofisário.

Nos ratos os níveis de ACTH e corticosterona produzidos pela hipófise nas duas primeiras semanas após parto são muito baixos. Da mesma forma, a glândula adrenal produz níveis muito baixos de hormônios corticosteróides, aumentando gradualmente com a puberdade (WALKER et al., 1986). No período hiporresponsivo ao estresse, as reações a estímulos ambientais são acompanhadas apenas por uma discreta elevação dos hormônios da adrenal, ao contrário dos animais adultos (GOULD et al., 1994; LEVINE, 1994).

Estimulação neonatal

A estimulação neonatal tem sido utilizada há algumas décadas como modelo experimental para examinar os mecanismos pelos quais variações precoces do ambiente do animal afetam o desenvolvimento de sistemas neurais, dando origem a alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis (LEVINE et al., 1967; LIU et al., 1997).

A estimulação neonatal tem efeitos ao longo da vida, no comportamento e reação ao estresse, afetando também o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (PADOIN et al., 2001; GOMES et al., 1999).

Em ratos, a estimulação neonatal tipicamente consiste da “manipulação” pelo experimentador dos animais por alguns minutos, em geral durante as duas primeiras semanas de vida. Esse procedimento aparentemente não nocivo ao indivíduo tem como consequência na vida adulta, uma série de alterações comportamentais e endócrinas que se caracterizam por uma diminuição da secreção de glicocorticóides pela supra-renal, quando os animais são expostos a novos estímulos estressores (LEVINE, 1993; MEANEY et al., 1993).

Para explicar os efeitos comportamentais e endócrinos no animal adulto, de uma estimulação realizada meses antes no período neonatal, é necessário hipotetizar que aquela estimulação provoca uma alteração estável, provavelmente plástica, no sistema neuroendócrino ou em estruturas neurais que modulam o sistema neuroendócrino. Além dos esteróides adrenais, os gonadais podem afetar o desenvolvimento do sistema nervoso em períodos críticos.

Os efeitos do estresse sobre os níveis de corticosterona de animais que foram submetidos à estimulação neonatal são bem estudados (LEVINE et al., 1967; LEVINE, 1993; MEANEY et al., 1993; LIU et al., 1997). No entanto, as possíveis alterações que podem ocorrer na secreção de outros hormônios sensíveis ao estresse não foram ainda completamente estudadas.

Estudos em nosso laboratório mostraram que a estimulação tátil dos filhotes nos primeiros 10 dias de vida causou alterações morfológicas estáveis que consistem na diminuição no número de neurônios no LC em ambos os sexos (LUCION, 2003). Além disso, verificou-se que em ratas a manipulação neonatal induziu uma redução significativa no número de neurônios da região parvocelular do PVN, e um aumento na densidade de neurônios na área CA1 do hipocampo (lado esquerdo). No entanto, os experimentos não revelaram efeitos da manipulação neonatal sobre os neurônios e células gliais da amígdala (WINKELMAN-DUARTE, 2004). Porém, LUCION et al (1999), verificou que na amígdala medial, a manipulação neonatal também promove uma diminuição no número de neurônios das camadas 2 e 3 do córtex frontal aos 11 e 90 dias de idade em machos e fêmeas.

Trabalhos prévios mostraram que estímulos estressantes durante os períodos de diferenciação sexual do sistema nervoso central (pré-natal e logo após o nascimento) induzem a alterações estáveis que se manifestam pela diminuição do comportamento sexual de machos e fêmeas (WARD, 1972; PADOIN et al., 2001).

Nos ratos durante o período hiporresponsivo tanto as estimulações aparentemente inofensivas quanto os estímulos estressores induzem a alterações endócrinas e comportamentais (LEVINE, 1994) na idade adulta. Esses efeitos, poderiam ser devidos à ação direta da manipulação ou associado ao comportamento maternal, em que a mãe estimula com mais intensidade os filhotes que são manipulados (LUCION, 1996).

Ratos que foram manipulados durante o período neonatal apresentam uma diminuição do medo, ou seja são mais ativos aumentando a atividade exploratória e defecam menos quando expostos a ambientes novos (FERNÁNDEZ-TERUEL et al., 1991). Animais manipulados ou submetidos a estímulos aversivos (luz, som e frio) quando expostos ao campo aberto na presença de um predador natural como o gato, mostraram uma diminuição da ansiedade frente ao predador durante e após a presença do mesmo (PADOIN et al., 2001).

Ratos que foram somente expostos a um ambiente novo no período neonatal durante 3 minutos quando testados aos 23 dias de idade apresentaram também uma menor inibição comportamental no campo aberto que é dependente do sexo, ou seja, os machos apresentam uma maior atividade exploratória em relação às irmãs fêmeas. No entanto os animais que permaneceram no ninho sem romper o vínculo familiar apresentaram resultados opostos, ou seja, quando comparados entre si, às fêmeas apresentaram uma maior atividade em relação aos machos irmãos testados no campo aberto (TANG et al., 2003 a).

O procedimento no qual metade dos filhotes de cada ninhada foram expostos durante 3 minutos a um novo ambiente com maravalha limpa no período neonatal, mostrou que a simples retirada dos filhotes do convívio familiar é um estímulo suficientemente intenso para promover uma redução na reatividade emocional nestes animais, evidenciando que a estimulação táctil dos filhotes e a separação maternal não foram necessárias para promover estas respostas de diminuição do medo nestes animais (TANG, 2001).

O procedimento de retirar metade dos filhotes do ninho e expor em um novo ambiente também promove nestes animais um aumento no aprendizado no labirinto aquático de "Morris", aumento ao longo do tempo na preferência ao odor de recompensa (TANG, 2001), aumento na memória de reconhecimento social (TANG et al., 2003; REEB & TANG, 2005), aumento na modulação da transmissão sináptica, menores níveis basais de corticosterona (ZOU et al., 2001) e aumento na plasticidade sináptica em relação aos irmãos que permaneceram no ninho (TANG & ZOU, 2002).

Animais manipulados nas 3 primeiras semanas de vida mostraram um aumento na concentração de receptores glicocorticóides no hipocampo (MEANEY et al., 1985 a) e postula-se que as diferenças endócrinas entre animais estimulados e não estimulados ocorram devido a essa diferença (MEANEY et al., 1993; SAPOLSKY, 1994). Já nos primeiros dias de vida do animal, a concentração de receptores

glicocorticóides no hipocampo está relativamente baixa, em torno de 20% quando comparado ao indivíduo adulto (CLAYTON et al., 1977; MEANEY et al., 1985 b).

Ratos manipulados apresentam uma menor secreção de corticosterona quando comparados aos ratos não manipulados. Sabe-se que ratos manipulados na infância têm uma resposta menor da adrenal na secreção de glicocorticóides em situações de estresse quando testados na idade adulta e além disso, o retorno desses hormônios aos níveis basais ocorre mais rapidamente em animais manipulados comparados aos não manipulados (LEVINE et al., 1993; MEANEY, 1993).

Contudo, os níveis basais de corticosterona de animais manipulados e não-manipulados não diferem entre si quando adultos. As diferenças entre eles parecem ser devidas a uma sensibilidade diferencial do sistema nervoso central ao mecanismo de retroalimentação negativa do eixo HPA (LEVINE, 1994). Postula-se que a menor reatividade a estímulos estressores na vida adulta de animais estimulados na infância seria devida a uma alteração permanente de estruturas do sistema nervoso central que modulam a atividade do eixo HPA (MEANEY et al., 1994; LIU et al., 1997).

Separação Maternal

Os modelos de separação maternal consistem em afastar os filhotes da mãe por um período que pode variar de 1 a 6 horas por dia, durante os primeiros dias após o nascimento ou por uma única vez com a privação materna contínua por 24 horas em um determinado dia entre o nascimento e o desmame (PLOTSKY & MEANEY, 1993; WIGGER & NEUMANN, 1999; SWANSON et al., 1984).

Períodos longos de separação maternal que variam de 1, 3, 6 e até 24 horas podem alterar as vias de respostas ao estresse, uma vez que a mãe é a primeira ligação entre o filhote e o meio ambiente (FRANCIS & MEANEY, 1999 a e b). Os ratos que sofreram a separação maternal periódica respondem mais intensamente a um

estímulo estressante quando adultos (PLOTSKY & MEANEY, 1993). Estes resultados são confirmados por WIGGER E NEUMANN (1999), em ratos adultos (4 a 5 meses), que sofreram 3 horas de separação maternal diárias nas duas primeiras semanas de vida.

Em geral, animais que foram afastados da mãe no período neonatal apresentam menor atividade no campo aberto (OGAWA et al., 1994). Quando adultos, os animais privados do contato maternal mostraram aumento nos comportamentos relacionados com ansiedade. BIAGINI et al. (1998), observaram que os ratos separados por 5 horas por dia do 2º ao 6º dia pós-parto apresentaram, quando adultos, maior secreção de corticosterona após uma sessão de estresse. Estes ratos também apresentaram uma menor quantidade de receptores de glicocorticóides ativados na área CA1 no hipocampo após o estresse (VAN OERS et al., 1998). Após 24 horas de privação maternal e logo após um estresse agudo, o nível de ACTH e de corticosterona plasmática em filhotes de 6 e 12 dias é significativamente mais alto do que aqueles que ficaram com a mãe antes do estresse (DENT et al., 2000).

Sabendo-se que os receptores para glicocorticóides no hipocampo estão relacionados com a retroalimentação negativa da resposta ao estresse, então a separação periódica no período neonatal pode causar uma diminuição da eficácia do controle adrenocortical do eixo HPA quando adultos.

Ratos machos adultos separados da mãe por 6 horas diárias no período neonatal apresentaram comportamento sexual reduzido além de uma latência maior em montar na fêmea receptiva (RHEES et al., 2001).

Estes dados indicam que a separação da mãe na infância faz com que os adultos pareçam ter mais medo em um ambiente novo, como o campo aberto ou o labirinto em cruz elevado (WIGGER & NEUMANN, 1999; OGAWA et al., 1994). Ao contrário, a breve estimulação durante 3 a 15 minutos faz com que apresentem menos medo em ambientes novos.

Segundo SCHANBERG & KUHN (1995), importantes alterações bioquímicas em filhotes de 10 dias estão relacionadas à privação do contato maternal, pois diminuiu em quase a metade a concentração plasmática do hormônio do crescimento (GH) quando comparados ao controle. Mas o GH sérico tende a voltar ao normal se os filhotes forem gentilmente escovados durante a separação (LEVINE, 2001). Além disso apresentaram uma maior expressão em células hipotalâmicas e hipocâmpais do fator de crescimento neural (NGF) após um período longe da mãe, que variava de 1 a 3 horas (CIRULLI et al., 2000).

Ratos recém-nascidos afastados da mãe por um período de 24 horas, mantidos na temperatura do ninho, mas sem alimentação mostraram alterações ao longo do desenvolvimento, com o retardo na abertura dos olhos, no aparecimento dos pêlos e na abertura vaginal (SWANSON et al., 1984).

Comportamento maternal e a relação mãe-filhote

Em mamíferos, incluindo roedores, primatas e humanos, a mãe é a fonte que garante o alimento para os filhotes e mais que isto, uma complexa interação nesta relação está envolvida além da necessidade nutricional, afinal é a mãe que provém à temperatura essencial dos filhotes no ninho, mantém-se atenta aos estímulos visuais, olfatórios e auditivos em relação à ninhada por um extenso período no desenvolvimento pós-natal (PRYCE & FELDON, 2001).

Os filhotes de ratos, assim como a maior parte dos roedores nascem altriciais, isto é, são parcialmente imóveis, desprovidos de pêlos, surdos e cegos, incapazes de se locomover e de regular sua temperatura. Perto da data do parto, a mãe inicia uma sequência de mudanças comportamentais que visam receber adequadamente os filhotes. Ela muda seus padrões de limpeza corporal, levando mais tempo na região

mamária e, alguns dias antes do parto, ela constrói um ninho com o substrato disponível (TODESCHINI, 2002).

As variações no cuidado maternal têm sido utilizadas como uma influencia critica no desenvolvimento do indivíduo. Em ratos, as variações no comportamento maternal, particularmente o comportamento de lambar e limpar (licking/grooming) os filhotes são os responsáveis por regular o desenvolvimento das respostas endócrinas, emocionais e cognitivas em resposta ao estresse (MACRI et al., 2004; CHAMPAGNE et al., 2003; PRYCE et al., 2000; CALDJI et al., 2000; LIU et al., 1997; DENENBERG, 1962; VAN DER OERS et al., 1998; PLOTSKY & MEANEY, 1993).

Nos ratos, o comportamento maternal ocorre com maior frequência nos primeiros dez dias após o parto (GROTA & ADER, 1969; 1975) principalmente na fase clara nas primeiras horas do dia (CHAMPAGNE et al., 2003) e diminui a partir daí. Depois de duas semanas do nascimento há um declínio gradual dos cuidados maternos, até que ocorra a rejeição dos filhotes pela mãe no desmame (REISBICK et al., 1975), que ocorre aproximadamente aos 28 dias de vida.

Após o parto, a rata lactante se engaja em manter uma série de comportamentos com os filhotes. Muitos cuidados ocorrem a partir de estímulos originados pelos filhotes. A mãe fica a maior parte do tempo sobre os filhotes para mantê-los aquecidos (GROTA E ADER, 1969). Além disso, as mães mantêm-se por cima dos filhotes com uma postura arqueada fazendo com que as mamas fiquem mais expostas e facilitando a ejeção do leite pelo estímulo de sucção dos filhotes ou fazendo a limpeza corporal e lambendo o filhote (STERN & JOHNSON, 1990).

Ao testarem o comportamento maternal de lactantes com filhotes mortos e vivos, Stern & Johnson (1990), observaram que os filhotes devem estar quentes, serem ativos e emitirem vocalização para que a mãe apresente postura cifótica de amamentação.

O comportamento de lambar os filhotes é um importante estímulo tátil que pode influenciar no desenvolvimento social de machos e fêmeas adultos (BIRKE &

SADLER, 1987; MOORE, 1992), e também influencia o comportamento maternal futuro, pois em fêmeas que no período neonatal receberam maior quantidade de lambidas ficarão mais tempo com os filhotes e cuidarão mais destes quando forem mães (FRANCIS et al., 1999).

A manipulação neonatal por sua vez representa uma intervenção feita na relação mãe-filhote. Em ratos, este procedimento consiste usualmente em afastar os filhotes do ninho por 3 – 15 minutos, em que neste caso a manipulação não representa uma privação materna, visto que ao longo do dia as mães normalmente ficam longe do ninho por períodos maiores entre 20 e 25 minutos (CALDJI et al., 1998). Esta intervenção pode incluir ou não a estimulação tátil dos filhotes pelo experimentador ao tocar gentilmente os filhotes geralmente durante as duas primeiras semanas de vida do animal durante o período hiporresponsivo ao estresse.

Estudos realizados sobre a interação mães e filhotes, mostraram que as fêmeas que tinham seus filhotes manipulados aumentavam a frequência de lambar os filhotes (TODESCHINI, 2002) quando comparadas às fêmeas com filhotes não manipulados, evidenciando que esse comportamento pode ser regulado por essa interação mãe-filhote, pelo fato de que a manipulação neonatal aumenta a vocalização ultra-sônica em filhotes, gerando um aumento do cuidado com os mesmos (DONG et al., 1997). As mães de filhotes manipulados lambem mais seus filhotes do que mães de filhotes não manipulados (LEVINE, 1991).

Os filhotes adultos de ninhadas que tiveram um comportamento maternal de cuidado maior durante os 10 primeiros dias de idade, tiveram uma redução do hormônio adrenocorticotrófico no plasma, com aumento de receptores para glicocorticóides no hipocampo, com aumento da sensibilidade na retroalimentação dos glicocorticóides e diminuição dos níveis de hormônio liberador corticotrófico (DONG et al., 1997).

Os trabalhos prévios de FRANCIS et al. (1999a); CALDJI et al. (1998); LIU et al. (1997), mostram que as mães apresentam diferenças no comportamento de

lamber os filhotes e de amamentação com dorso arqueado nos primeiros dias pós-parto.

FRANCIS & MEANEY (1999), testaram modelos experimentais de estimulação táctil dos filhotes e a exposição a um novo ambiente por um período de 12 a 15 minutos. Estes procedimentos condizem com os modelos de estimulação neonatal no qual um breve período (3 a 15 minutos) de separação diária dos filhotes do contato materno está envolvido. Nestes experimentos verificaram que o cuidado maternal das ninhadas contribui ativamente para o desenvolvimento normal dos sistemas neurais que medeiam as respostas ao estresse e que aparentemente a ausência da mãe rompe o desenvolvimento natural desses sistemas. Neste mesmo trabalho (FRANCIS & MEANEY, 1999), evidenciam que a manipulação neonatal se caracteriza por romper a rotina do convívio familiar, ou seja, rompe a interação mãe-filhote nos breves intervalos em que a mãe e os filhotes são separados.

LIU et al. (1997), verificaram que quando os filhotes são manipulados suas mães aumentam o cuidado da ninhada por apresentarem uma frequência e duração de lambidas e limpeza (licking/grooming) maior de seus filhotes, comparadas às mães de ninhadas não manipuladas. No entanto, o tempo total de permanência em contato com os filhotes foi o mesmo entre as mães de filhotes manipulados e não manipulados. Se o cuidado materno desempenha um papel crítico para o desenvolvimento de um indivíduo normal, entender como as variações no cuidado materno se refletem nos padrões de respostas comportamentais e neuroendócrinas nos animais adultos e qual o papel que desempenha para o desenvolvimento dos indivíduos tem nos despertado grande interesse.

Curiosamente, FRANCIS et al. (1999b); CALDJI et al. (1998); LIU et al. (1997) ao analisar uma população inteira de ratos observaram que naturalmente há mães muito cuidadosas e mães que cuidam pouco seus filhotes e o parâmetro adotado para analisar estas mães foram os comportamentos de lambar, limpar os filhotes e de dorso arqueado. Portanto, há mães que sem nenhum estímulo aplicado pelo

experimentador na ninhada, cuidam mais de seus filhotes lambendo-os, limpando-os ou fazendo dorso arqueado.

Considerando esta característica natural e peculiar de cada rata primípara, após o parto, de ser uma mãe cuidadosa ou pouco atenciosa para sua ninhada, (CHAMPAGNE et al., 2001) passou-se a estudar as possíveis variações no comportamento maternal e surpreendentemente verificaram que às variações naturais que ocorrem no cuidado maternal influenciam o desenvolvimento neural das ninhadas subseqüentes e estas variações são transmitidas da mãe para as filhas. Além disso, quando as ratas virgens filhas de mães muito cuidadosas são constantemente expostas ao contato de filhotes neonatos, estas ratas apresentam uma indução do comportamento maternal mais rapidamente que ratas virgens filhas de mães pouco cuidadosas, o que nos sugere que além das características comportamentais de cuidado com a prole, há uma diferença na responsividade da fêmea para o comportamento maternal.

Ninhadas oriundas de mães muito cuidadosas apresentaram aumento na densidade sináptica no hipocampo e melhor desempenho no aprendizado e memória espacial (BREDY et al., 2003; LIU et al., 2000). Porém, nos experimentos em que os filhotes de mães pouco cuidadosas, foram adotados por mães muito cuidadosas, verificou-se que quando estes animais foram testados na idade adulta, apresentaram os mesmos padrões comportamentais dos filhotes biológicos destas mães muito cuidadosas, ou seja, agiram como se não fossem adotados, indicando que há um fator não genético na transmissão destas características e possivelmente seja pelo estímulo táctil da mãe em lamber a região anogenital e o corpo dos filhotes e esse estímulo é muito importante para o desenvolvimento normal da maioria dos mamíferos (FRANCIS et al., 1999).

Apesar dos fatores genômicos serem importantes para o comportamento maternal em geral, alguns pesquisadores (CHAMPAGNE et al., 2001; CALDJI, 1998, 2000;) têm mostrado evidências não genômicas bastante consistentes para a

transmissão das diferenças no comportamento maternal de ratas. Entre as evidências, podemos citar o experimento no qual filhas biológicas de mães pouco cuidadosas foram criadas por mães muito cuidadosas. Estas ratas quando expostas a um novo ambiente, apresentam menos medo. Além disso, essas fêmeas quando foram mães, apresentaram uma postura de cuidado dos filhotes semelhantes às mães naturalmente mais cuidadosas. Isso mostra que o comportamento maternal tem um efeito que se mantém, ou seja, apresenta um perfil padrão nas respostas de medo ou ansiedade nos animais adultos e na transmissão das características maternais de cuidado com a prole da mãe em relação às filhas biológicas ou de criação (CHAMPAGNE & MEANEY, 2001).

Os estudos com a manipulação neonatal incluem desde a estimulação tátil dos filhotes por 1 a 15 minutos, a exposição a um novo ambiente por 3 a 15 minutos ou somente a breve separação materna por 15 min diários normalmente nas duas primeiras semanas de vida. Nestes modelos experimentais, a intervenção na relação mãe-filhote reduz a ansiedade em ratos quando adultos, atenua a secreção de corticosterona em resposta ao estresse e melhora o desempenho em testes cognitivos (DARNAUDÉRY et al., 2004).

Vários autores (FRANCIS et al., 1999; LIU et al., 1997) observaram que a manipulação neonatal (estimulação tátil dos filhotes) altera o comportamento maternal evidenciado pelo aumento na frequência de amamentação com dorso arqueado e na frequência de lambar os filhotes. Além disso, a manipulação neonatal causa uma intervenção na relação mãe-filhote por promover breves intervalos na rotina da mãe, quebrando o vínculo com os filhotes repentinamente. Esses curtos episódios em que os filhotes são manipulados fazem com que a mãe além de lambar, permaneça por mais tempo em contato, com seus filhotes (CHAMPAGNE & MEANEY, 2001).

Há algumas décadas o estudo da interação mãe-filhote intriga muitos pesquisadores e os experimentos normalmente são realizados com a estimulação

neonatal dos filhotes ou pela privação materna. Estes estímulos variam desde a manipulação neonatal que pode ser estímulo tátil, a separação breve dos filhotes do contato com a mãe ou mesmo a exposição dos filhotes a fontes de som, luz ou frio.

Em todas as situações a hipótese era de que os animais que foram manipulados no período neonatal tinham mães que aumentavam o cuidado maternal em resposta ao aumento na vocalização dos filhotes e LEVINE (1991) já mostrava esses resultados quando verificou que as mães de filhotes manipulados lambem mais seus filhotes do que mães de filhotes não manipulados. Além disso, esses animais quando adultos apresentavam um padrão de respostas similares aos animais que tiveram mães naturalmente muito cuidadosas.

O procedimento da estimulação neonatal tem sido repetidamente demonstrado como um dos principais fatores responsáveis pela menor reatividade ao estresse nos animais adultos, porém tem-se que reconhecer que o procedimento da manipulação neonatal envolve três componentes (estimulação tátil dos filhotes pelo experimentador, separação da mãe pois a mãe é retirada da caixa residência durante o procedimento e a exposição dos filhotes a um ambiente não familiar).

Tang (2001), recentemente desenvolveu um novo modelo chamado “exposição neonatal a novidade” ou seja, exposição dos filhotes a um ambiente novo que representa o ninho porém com maravalha limpa. Este modelo isola os três componentes citados anteriormente e como resultado desta modificação procedimental do modelo descrito por S. Levine há algumas décadas a breve exposição durante 3 minutos a um novo ambiente durante as três primeiras semanas de vida do animal foram suficientes para reduzirem a reatividade emocional desses animais na idade adulta (Tang, 2001; Tang et al., 2003a).

JUSTIFICATIVA

Sabe-se que no período neonatal o organismo está muito sensível aos estímulos ambientais e que é nesse período que as primeiras relações sociais são formadas.

Há muitos anos têm-se despertado grande interesse em compreender quais os fatores do ambiente neonatal e como esses fatores interferem no comportamento e na fisiologia do animal durante a vida. Dentre os vários fatores, sabe-se que as intervenções na relação mãe filhote induzem a variações no comportamento maternal e que essas variações são consideradas como o principal mediador das respostas comportamentais e neuroendócrinas dos animais quando adultos.

Portanto, testamos a hipótese de que são as alterações do comportamento maternal que induzem às alterações comportamentais observadas nos ratos na idade adulta ou se somente a saída do convívio familiar pela exposição dos filhotes ao novo ambiente, alteram o comportamento dos animais na idade adulta.

OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos do comportamento maternal de ratas cujas ninhadas no período neonatal tiveram metade dos filhotes manipulados no ninho, enquanto a outra metade dos filhotes foram manipulados fora do ninho; e também verificar quais os possíveis efeitos que a exposição ao ambiente novo promoveria nas respostas comportamentais e endócrinas em ratos machos adultos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o comportamento maternal de ratas cujas ninhadas tiveram metade dos filhotes foram manipulados no ninho, e a outra metade dos filhotes foram manipulado fora do ninho no período neonatal.

Analisar o comportamento no campo aberto de ratos machos adultos que foram manipulados no ninho ou fora do ninho no período neonatal.

Analisar o comportamento sexual de ratos machos adultos que foram manipulados no ninho ou fora do ninho no período neonatal.

Analisar o comportamento de memória social de ratos machos adultos que foram manipulados no ninho ou fora do ninho no período neonatal.

Analisar a concentração plasmática de prolactina em resposta ao estresse de contenção de ratos machos adultos que foram manipulados no ninho ou fora do ninho no período neonatal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas ratas Wistar prenhas provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Estas ratas foram então colocadas individualmente em caixas de acrílico transparente (40x33x25cm). O dia do parto foi rigorosamente controlado. No dia seguinte ao nascimento, as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes e aos 21 dias de vida os animais foram desmamados e os machos foram mantidos em caixas num ambiente com temperatura controlada (22 ± 1 °C) e ciclo claro-escuro alternados a cada 12 horas (início do ciclo claro às 6:00), com água e ração "*ad libidum*".

Intervenções na relação mãe-filhote no período neonatal

Durante as duas primeiras semanas de vida, metade dos filhotes foram individualmente expostos em um ambiente novo (durante a manipulação neonatal) enquanto a outra metade da ninhada que permaneceu no ninho também foi manipulada. No dia 1 pós-parto, metade dos filhotes de cada ninhada foi cuidadosamente marcada e manipulada no ninho (dentro da caixa residência) enquanto a outra metade dos filhotes da ninhada foi marcada e manipulada no ambiente novo (fora da caixa residência).

De acordo com a Figura 1, primeiramente as mães foram retiradas da caixa residência. Os filhotes manipulados no ninho (MN) e os filhotes manipulados fora do ninho (MF) foram identificados examinando as marcas no corpo que foram feitas com uma caneta de marcação cirúrgica à base d'água "Codman Pen" (Johnson e Johnson). Depois de identificados, cada filhote que foi exposto ao ambiente novo foi colocado

em uma caixa nova com maravalha limpa e subseqüentemente retornou a caixa residência junto aos irmãos no ninho. Durante esta transferência, cada filhote que saiu do ninho também foi manipulado junto com o irmão correspondente que permaneceu no ninho. Portanto todo o procedimento foi feito com duplas de filhotes (1 manipulado no ninho e outro manipulado fora do ninho durante a exposição ao ambiente novo). Cada dupla de filhotes recebeu o mesmo tempo de estimulação táctil pelo experimentador que foi de 3 minutos. O procedimento terminava após todas as duplas de filhotes sofrer as intervenções descritas previamente, quando então imediatamente a mãe retornava para a caixa residência (TANG et al., 2003; TANG & REEB, 2004).

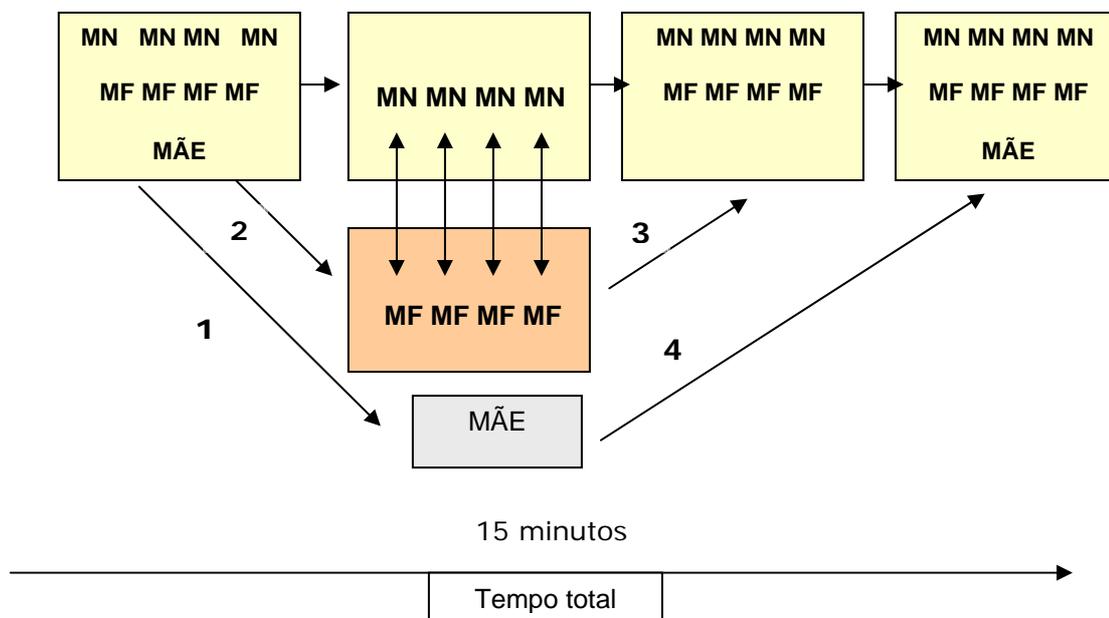


Figura 1. Ilustração do desenho experimental das intervenções na relação mãe-filhote: (1) A mãe foi retirada da caixa residência e colocada em uma caixa ao lado; (2) Cada dupla de filhote foi manipulada por 3 minutos; os filhotes (MN) foram manipulados no ninho e os filhotes (MF) foram manipulados fora do ninho. (3) Após a manipulação os filhotes (MF) retornavam ao ninho. (4) Ao final de todo o procedimento de manipulação a mãe foi devolvida junto à ninhada na caixa residência. O procedimento da manipulação teve duração de 3 minutos e se repetiu por 4 vezes nos primeiros 10 dias de vida dos filhotes até que todas as duplas de filhotes fossem manipulados. Todo o procedimento experimental teve duração de 15 minutos (TANG, 2001; TANG et al., 2003; TANG & REEB, 2004).

Protocolos Experimentais

Experimento I

Comportamento maternal

As ninhadas que sofreram as intervenções no período neonatal tiveram o comportamento maternal observado nos dias 1, 5 e 10 pós-parto.

A caixa residência foi levada para uma sala com temperatura de aproximadamente 22°C onde permaneceram por um período de 20 minutos para adaptação ao novo ambiente. Imediatamente após metade (n=4) dos filhotes de cada ninhada sofrer as intervenções descritas anteriormente iniciou-se a observação do comportamento maternal entre 9 e 12 horas da manhã (Figura 2).

Durante o registro do comportamento maternal observou-se a frequência e duração de lamber os filhotes.

O experimentador avaliou visualmente e anotou os comportamentos da rata lactante, sendo que cada comportamento observado foi cronometrado.

Os dados foram tabulados em uma planilha para posterior comparação do cuidado maternal entre os filhotes irmãos manipulado no ninho e manipulado fora do ninho.

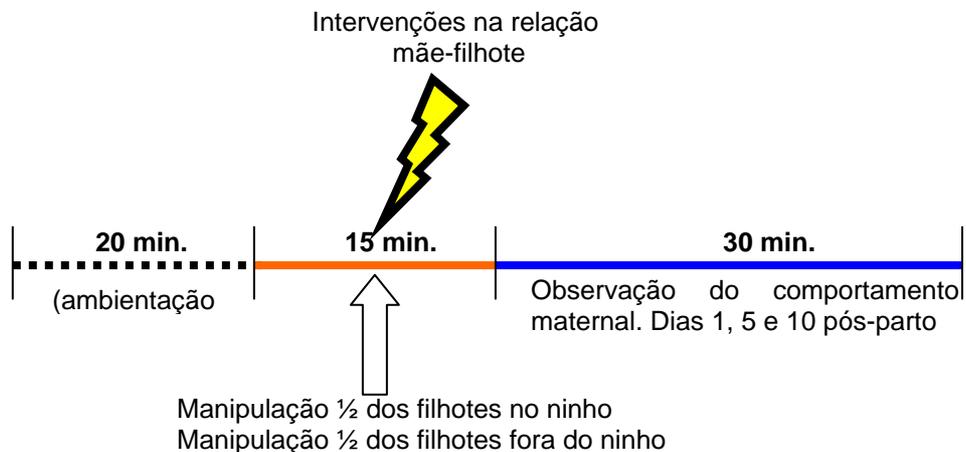


Figura 2. Procedimento do registro do comportamento maternal

Experimento II

Campo aberto

Todos os machos manipulados no ninho e manipulados fora do ninho descritos anteriormente, que sofreram as intervenções no período neonatal foram registrados no campo aberto na idade adulta entre 90 e 120 dias de idade. O número de animais de cada grupo foi de $n=15$.

O campo aberto consiste em uma caixa de $1,0 \text{ m}^2$ com paredes de 50 cm de altura e sua base dividida com linhas brancas perfazendo um total de 25 quadrantes (16 laterais e 9 centrais) de acordo com a figura 3.

A filmagem do comportamento (Figura 4) consiste no registro em vídeo dos ratos machos durante 5 minutos, e somente um rato por vez foi filmado no campo aberto. Os ratos machos foram levados para a sala de registro onde permaneceram

20 minutos para ambientação. Antes de cada registro comportamental, os ratos machos foram colocados em um canto do campo aberto sorteado aleatoriamente.

As fitas foram analisadas com auxílio do software “The Observer” especialmente desenvolvido para análises comportamentais, no caso para contagem de frequência, duração e latência de cada comportamento.

Os seguintes parâmetros comportamentais foram analisados: frequência e duração da locomoção total, frequência e duração da locomoção nos quadrantes centrais e a latência de entradas no centro do campo aberto.

A frequência representa o número total de vezes que o animal realizou cada comportamento durante cada registro, não considerando portanto a locomoção entre cada quadrante. A latência consiste no tempo em segundos transcorrido desde o início da sessão até a primeira vez que o comportamento analisado ocorreu. A duração é o somatório da ocorrência de um comportamento específico.



Figura 3. Campo aberto

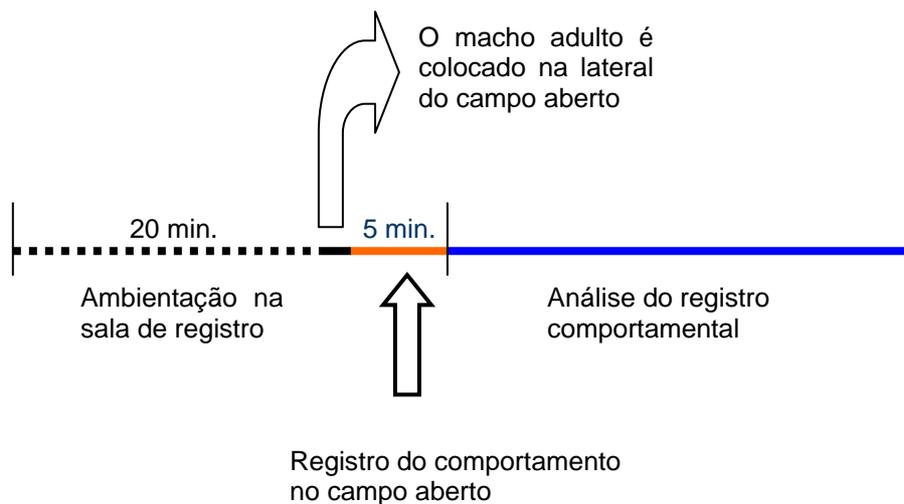


Figura 4. Ilustração do protocolo para o registro do comportamento no campo aberto.

Experimento III

Comportamento sexual

Os animais machos manipulados no ninho e manipulados fora do ninho tiveram o registro do comportamento sexual na idade adulta entre 90 e 120 dias de idade. O número de animais para cada grupo foi de $n=12$.

Os registros da atividade sexual foram realizados nas caixas de observação a partir das primeiras horas do período escuro, que iniciava sempre às 18:00 horas. Primeiramente, os machos foram retirados da caixa residência e levados para a sala de registro comportamental onde permaneciam por um período mínimo de 1 hora para adaptação ao novo ambiente antes do início do experimento de acordo com RASIA-FILHO (1994).

Após este procedimento o animal foi colocado na caixa de observação por um período de 10 minutos para adaptação a este ambiente. Esta caixa tinha a parede frontal de vidro transparente permitindo a visualização completa dos animais no seu

interior. Transcorridos 10 minutos, a fêmea previamente ovariectomizada e induzida a receptividade sexual com estrógeno e progesterona (doses hormonais e protocolos descritos adiante) foi colocada junto ao macho iniciando-se imediatamente a sessão de registro do comportamento sexual (filmadora e vídeo) com duração de 30 minutos (Figura 4).

Os comportamentos estudados foram à frequência e duração de cheirar os genitais: o macho se aproximava e fazia exploração olfativa da região genital da fêmea; a frequência de montas (com e sem intromissões): o macho colocava suas patas dianteiras no dorso da fêmea e além da monta podia ou não realizar movimentos pélvicos ritmados e introduzir o pênis na vagina da fêmea, encerrando esse comportamento com movimento vigoroso de “desmonta” da fêmea; a latência de ejaculação: tempo decorrido desde a primeira intromissão até a ocorrência da ejaculação; a duração do período refratário: quando os animais, após a ejaculação, permaneciam sexualmente inativos até que ocorresse uma nova monta com ou sem movimentos pélvicos ou intromissão.

Os critérios para o término da sessão de registro, de acordo com Rasia-Filho & Lucion (1996) foram: 30 min, após a introdução da fêmea, caso os machos exibissem intromissão mas não alcançassem a ejaculação, ou quando acabava o período refratário pós-ejaculação mesmo depois de transcorridos 30 min. de registro.

As fitas foram analisadas utilizando o software “The Observer” para contagem de frequência, duração e latência dos comportamentos analisados.

Indução da receptividade sexual

Aproximadamente 20 dias antes do experimento as fêmeas foram ovariectomizadas e antes de serem colocadas junto aos machos, tiveram a reposição hormonal com estradiol (Benzo-ginoestril ap®, SARSA), na dose de 5µg/0,2 mL/rata

48 horas antes do teste e no dia do teste repetiu-se a mesma dose de estradiol conjugado com progesterona (Progesterone, Sigma), na dose de 25 mg/0,2 mL/rata às 11 horas da manhã.

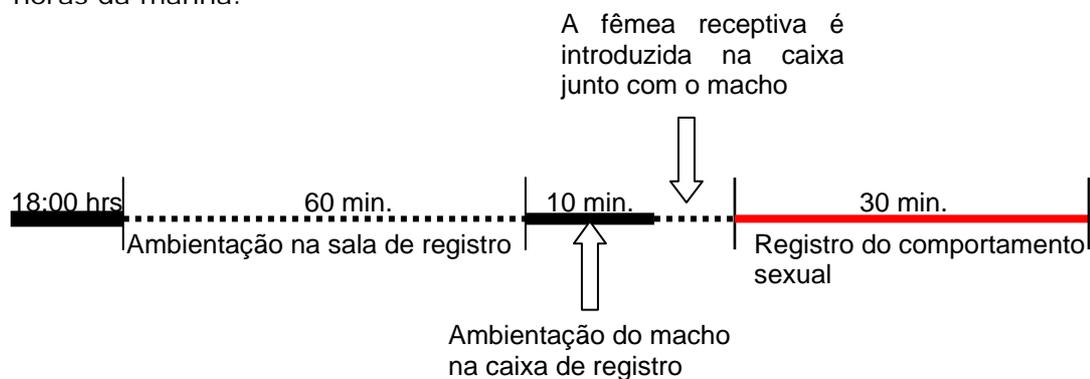


Figura 5. Ilustração do protocolo para o registro do comportamento sexual dos machos.

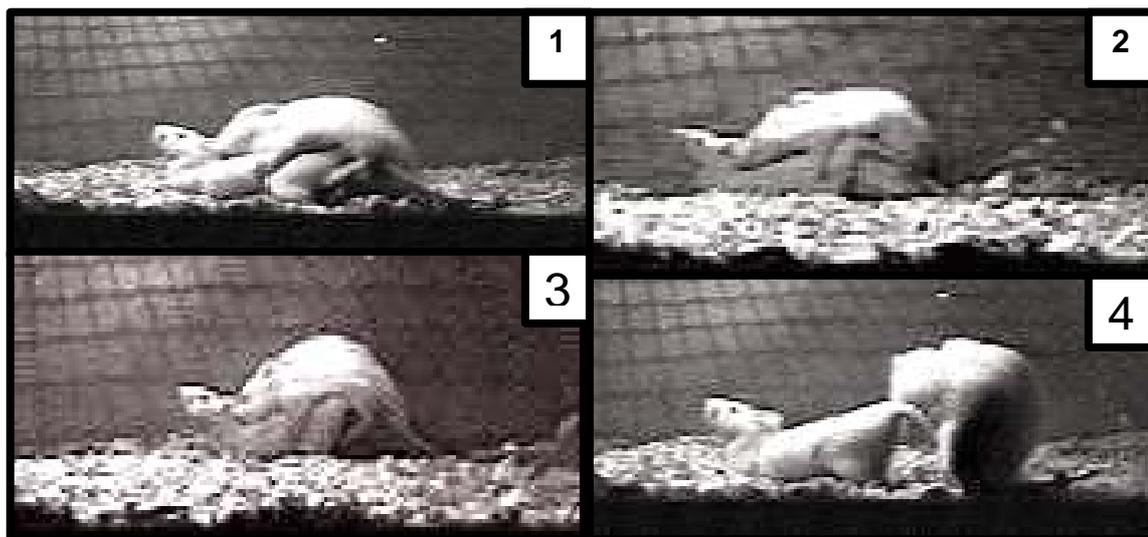


Figura 6. Comportamento sexual de machos. Em (1) o macho realiza uma monta na fêmea. Em (2) temos uma monta na fêmea com movimentos pélvicos mas sem intromissão peniana. Em (3) o macho realiza monta com intromissão peniana e com movimentos pélvicos e em (4) o macho está limpando os genitais após a intromissão; notar que durante e logo após a monta e/ou intromissão do macho, a fêmea permanece em posição de lordose. A posição de lordose é um dos principais indicativos de que a fêmea está receptiva ao macho e apta a realizar o comportamento sexual.

Experimento IV

Comportamento de memória social

Os filhotes manipulados no ninho e manipulados fora do ninho tiveram o comportamento de interação social registrado na idade adulta entre 90 e 120 dias de idade. O número de animais para cada grupo foi de $n=12$.

Primeiramente, os machos foram retirados da caixa residência e levados para a sala de registro comportamental onde permaneciam por um período mínimo de 1 hora para adaptação ao novo ambiente antes do início do experimento. Todos os registros foram realizados após uma hora de início da fase escura.

O experimento consistia em analisar os machos adultos expostos a um macho juvenil (intruso) com idade de aproximadamente 25 dias. O macho juvenil foi colocado na caixa do rato adulto e registrava-se o comportamento de reconhecimento e investigação social durante 2 minutos num total de 5 registros. Após cada registro, o rato juvenil foi retirado da caixa do rato adulto, e colocado em uma caixa com água e comida a vontade, por um intervalo de cerca de 18 minutos entre um registro e outro. Durante os 4 registros seqüenciais, o animal experimental foi apresentado ao mesmo juvenil e no quinto registro foi inserindo um juvenil desconhecido, também por 2 minutos (Figura 7).

Durante o teste, foram observados os comportamentos do adulto de cheirar e perseguir os juvenis e para cada comportamento, foram consideradas a frequência e a duração de cada comportamento.

Os registros foram feitos em duas fases. A primeira fase consistia no registro de animais experimentais adultos e virgens. No dia seguinte ao primeiro registro, os mesmos animais foram expostos a uma fêmea receptiva (idem protocolo do experimento 03 para ovariectomia e indução da receptividade sexual) para adquirirem experiência sexual. Transcorridos uma semana após a exposição à fêmea receptiva os

machos sexualmente experientes tiveram novamente o registro do comportamento de reconhecimento e investigação social avaliado ao serem expostos ao macho juvenil. Durante todo o período experimental os animais foram mantidos isolados nas caixas.

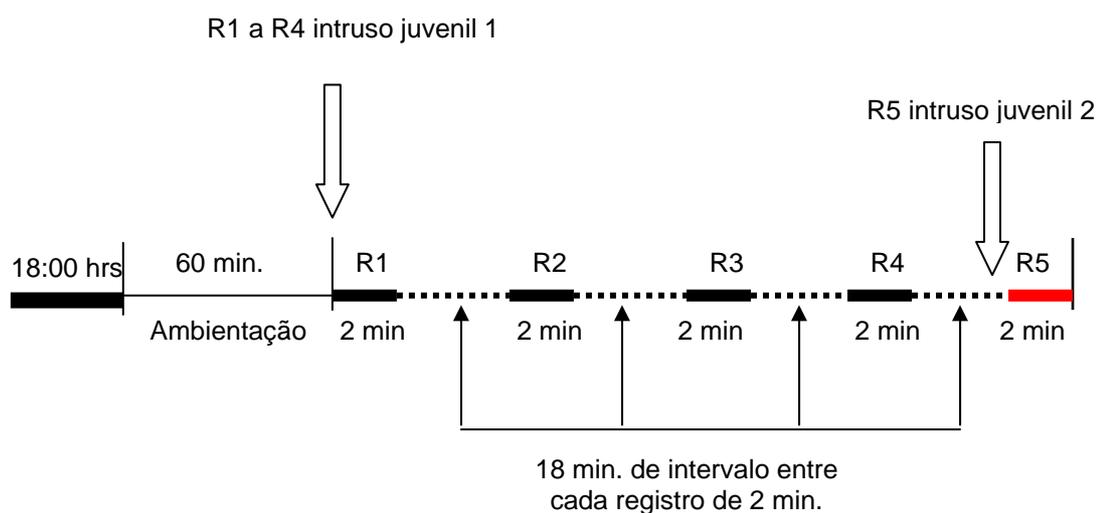


Figura 7. Ilustração do protocolo para o registro do comportamento de reconhecimento e interação social de machos adultos expostos ao intruso juvenil. O procedimento foi usado para os machos antes e após adquirirem experiência sexual.

Experimento V

Reatividade ao estresse de contenção

Ratos machos manipulados no ninho e manipulados fora do ninho tiveram a veia jugular externa canulada aos 90 dias de idade e posteriormente foram submetidos a um estresse por contenção.

Canulação da Veia Jugular

Os ratos machos foram anestesiados com solução de tribromoetanol (Aldrich Chem. Inc.) 2,5 % em salina com uma injeção intraperitoneal. A dose utilizada foi 1mL/100g de peso corporal.

Após o animal estar anestesiado, seguindo a técnica de HARMS & OJEDA (1974) a veia jugular externa foi exposta e uma cânula de silicone foi introduzida com uma agulha de implantação. A cânula foi suturada no músculo peitoral maior e a parte livre da cânula foi externalizada no pescoço, na região dorsal um pouco abaixo das orelhas. A cânula foi mantida com solução fisiológica até o momento da coleta de sangue.

Coletas de Sangue

Após uma hora de ambientação em uma sala silenciosa e com temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, iniciou-se as coletas de sangue (Figura 8). Amostras de 600 μL de sangue foram coletadas em seringas plásticas heparinizadas num total de 4 coletas (basal, 2,

5 e 15 minutos de estresse por contenção). Após a coleta basal de sangue, o animal era colocado num tubo contensor de acrílico transparente para as coletas posteriores. Após a remoção de cada amostra de sangue durante as coletas, um volume igual de NaCl 0,9% solução estéril foi repostado no animal. Todas as coletas iniciaram à tarde a partir das 14 horas. O sangue foi centrifugado e estocado para posterior dosagem de prolactina por radioimunoensaio.

As amostras foram colocadas em tubos plásticos e centrifugados a 3000 rpm durante 25 minutos, o plasma foi separado e estocado a -70°C para posterior dosagem hormonal.

Dosagem Hormonal

As concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) foram determinadas por radioimunoensaio utilizando-se Kits específicos fornecidos pela National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIADDK, Baltimore – USA). O hormônio foi medido num simples ensaio no qual o limite mínimo para a detecção da prolactina foi de 0,09ng/mL.

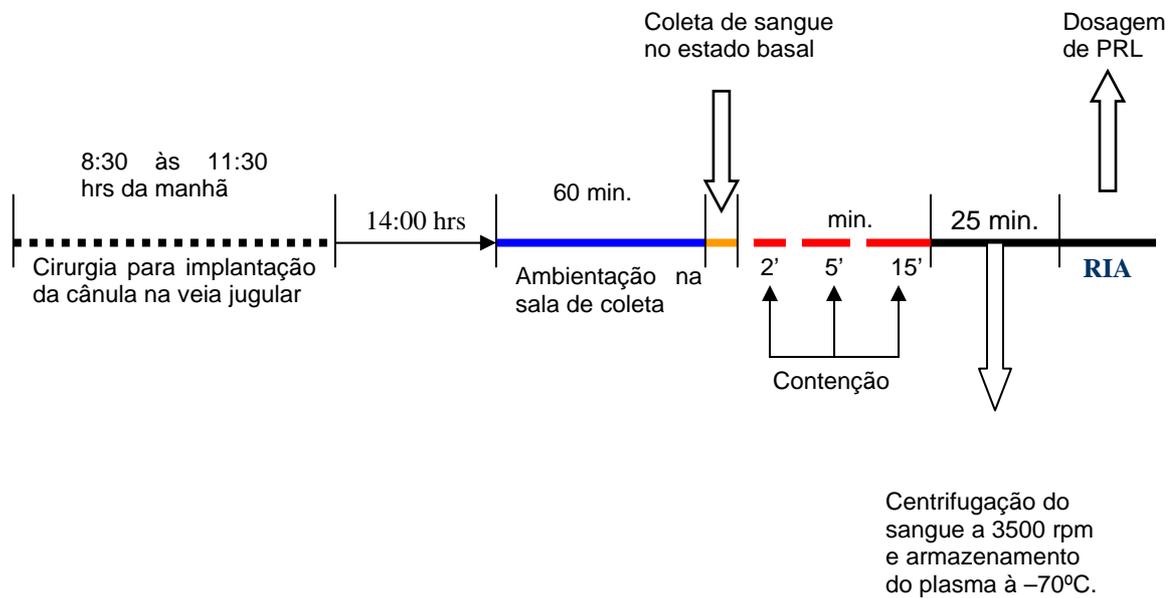


Figura 8. Ilustração do protocolo para a coleta de sangue de machos adultos durante o estresse por contenção.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em relação aos resultados de comportamento maternal, campo aberto e comportamento sexual, a mediana (intervalo interquartil) dos comportamentos analisados foi comparada através do teste de Wilcoxon entre os animais manipulados no ninho e manipulados fora do ninho. Para os resultados dos testes no estresse de contenção referentes às concentrações plasmáticas de prolactina, e no teste de interação social dos animais manipulados no ninho e manipulados fora do ninho a comparação dos dados (Média \pm EPM) foi feita através da ANOVA seguida de Newman-Keuls. A área abaixo da curva da concentração plasmática de prolactina foi analisada através do teste t e os resultados também foram expressos por (Média \pm EPM). O nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

As medidas dos comportamentos foram expressas em frequência (número de vezes), duração (em segundos) e latência (em segundos). Os resultados do comportamento maternal foram obtidos pela observação dos comportamentos da mãe nos dias 1 5 e 10 pós-parto, porém foram apresentados através da soma total dos 3 dias. Serão apresentados portanto, os resultados obtidos no comportamento maternal, e após, os resultados obtidos nos testes com os ratos machos adultos oriundos do comportamento maternal.

Em cada comparação, os dados significativos (quando houver) foram descritos independente da ordem que o teste foi realizado ou do parâmetro comportamental analisado, sendo seguidos da descrição de algumas tendências. Os resultados relevantes mas não significativos também foram descritos. Todos os resultados descritos foram expressos em gráficos.

1 – Comportamento Maternal

No comportamento maternal (Figura 9-A) a frequência total de lambe os filhotes, não apresentou aumento significativo entre os irmãos MN [14,5 (5,5/4)] e MF [13 (3,5/7,5)]. Da mesma forma, a duração total de lambe os filhotes (Figura 9-B) não foi diferente entre os irmãos MN [255 (167/282)] e MF [220,5 (121,5/365,5)].

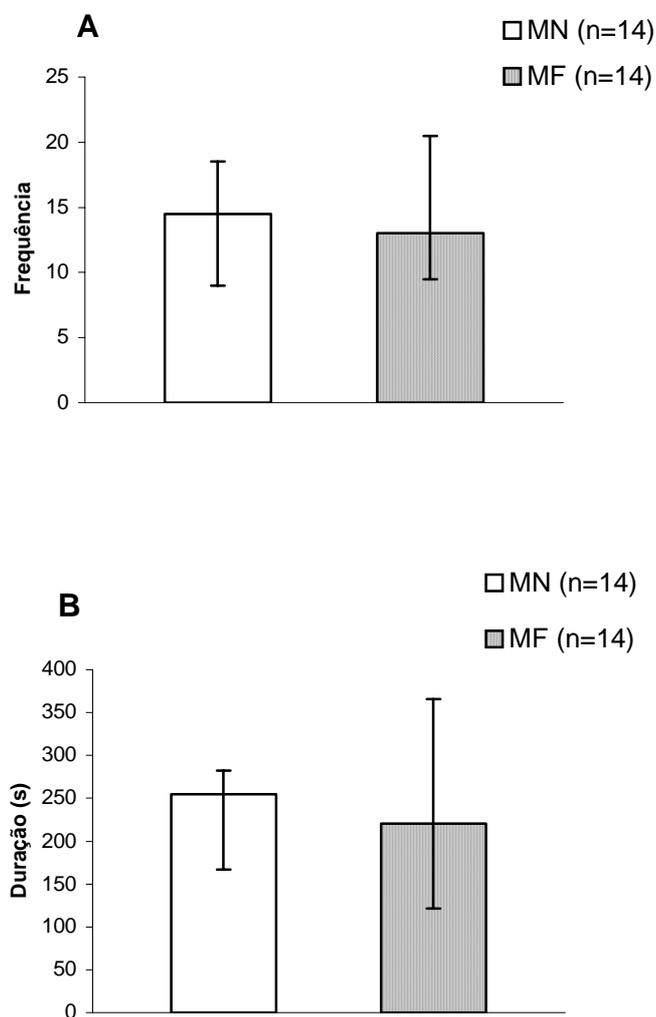


Figura 9. Comportamento materno de lambar os filhotes nos dia 1, 5 e 10 pós-parto. Os resultados foram apresentados pela soma total dos dias analisados. Em A temos a frequência e em B a duração do comportamento materno. O comportamento materno foi analisado durante 30 minutos em cada dia logo após o retorno da mãe a caixa residência. Os resultados foram expressos pela mediana (intervalo interquartil) e analisados através do teste de Wilcoxon para $p \leq 0,05$ de significância.

2 – Comportamento dos ratos machos adultos no campo aberto

No campo aberto, a Figura 10-A mostra-nos que houve um aumento significativo na latência de ir ao centro do campo aberto dos animais MF [93 (77/226,8)] comparados com os MN [54,1 (22,5/99,85)], pelo teste de Wilcoxon, $p=0,0067$, mostrando que os animais expostos a um novo ambiente quando comparados aos seus irmãos que foram manipulados no ninho no período neonatal, se expõem mais rapidamente ao centro do campo aberto quando testados na idade adulta.

Em relação a frequência de ir ao centro do campo aberto (Figura 10-B) os animais MF [4 (2/7,5)] apresentaram uma frequência maior quando comparados aos irmãos MN [2 (2/2/4)] que permaneceram no ninho; $p=0,0042$. Além disso, de acordo com a Figura 10-C os animais MF [13,8 (7,65/41,45)] ficam mais tempo no centro do campo aberto, comparados aos irmãos MN [5,12 (3,5/14,5)]; $p=0,0084$.

Em relação à locomoção total no campo aberto, apesar da frequência da locomoção total ter sido igual entre os irmãos MN [26 (6/7,5)] e MF [25 (3,5/6)] (Figura 11-A) a duração da locomoção total (Figura 11-B) foi maior nos animais MF [133,6 (7,9/19,8)] quando comparados aos irmãos MN [113,7 (30,6/36,2)].

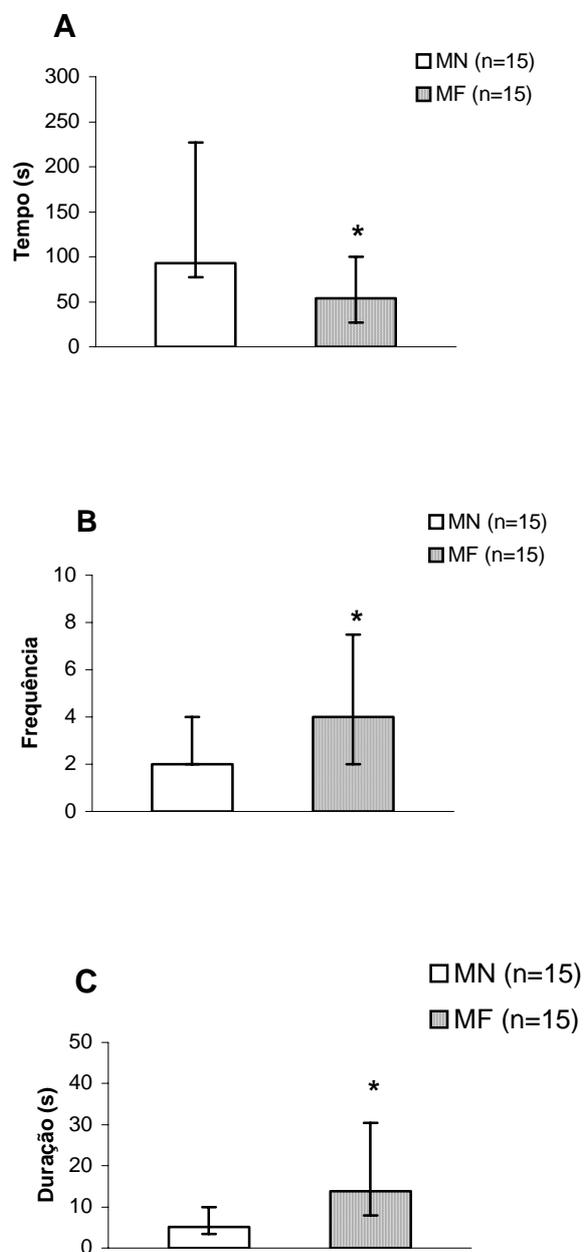


Figura 10. Comportamento no campo aberto. Em A, B e C tem-se a latência, frequência e a duração de ir ao centro do campo aberto, respectivamente. Os ratos foram observados durante 5 minutos. *Diferença significativa comparando os animais MF em relação aos irmãos MN. Os resultados foram expressos pela mediana (intervalo interquartil) e analisados através do teste de Wilcoxon para $p \leq 0,05$ de significância.

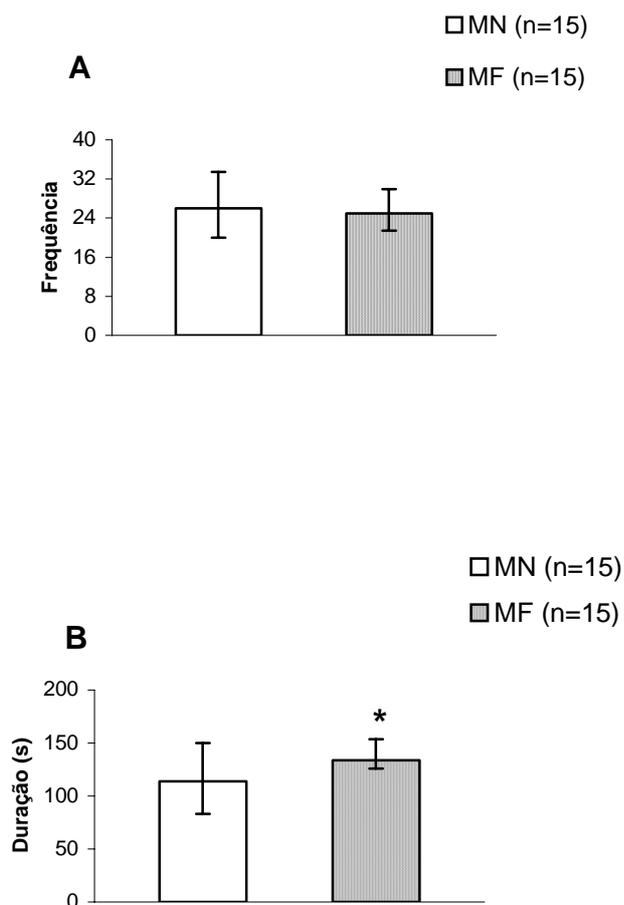


Figura 11. Comportamento no campo aberto. Em A e B tem-se respectivamente a frequência e a duração da locomoção total no campo aberto. Os ratos foram observados durante 5 minutos. *Diferença significativa comparando os animais MF em relação aos irmãos MN. Os resultados foram expressos pela mediana (intervalo interquartil) e analisados através do teste de Wilcoxon para $p \leq 0,05$ de significância.

3. Comportamento sexual dos ratos machos adultos

No comportamento sexual, de acordo com a Figura 12, os animais MF permaneceram mais tempo cheirando os genitais da fêmea receptiva. Neste comportamento analisado, tanto a frequência (Figura 12-A) dos animais MF [20 (16/28,5)] em relação aos irmãos MN [7 (2,5/10)]; $p=0,0098$, quanto à duração (Figura 12-B) dos animais MF [54,15 (36,9/134,7)] foi maior comparado aos irmãos MN [24,9 (8,1/42,75)]; $p=0,02$.

Em relação ao comportamento de monta, a Figura 13-A mostra-nos que não houve diferença significativa no comportamento de monta entre os irmãos MN [12 (1,5/5)] e MF [14 (2/4)]. Porém, quando analisado o comportamento de monta com intromissão (Figura 12-B), notamos que o número de intromissões dos animais MF [11 (6,5/17)] foi menor quando comparado aos seus irmãos MN [18 (14,5/22,5)]; $p=0,02$. Além disso, a Figura 14-A mostra-nos que a latência de ejaculação dos animais MF [1298 (1058/1801)] foi significativamente maior que dos animais MN [947,8 (802,3/1070)]; $p=0,03$. No entanto, o período refratário (Figura 14-B) não foi diferente entre os irmãos MN [355,5 (68,4/60,9)] e MF [459,9 (178,9/37,1)].

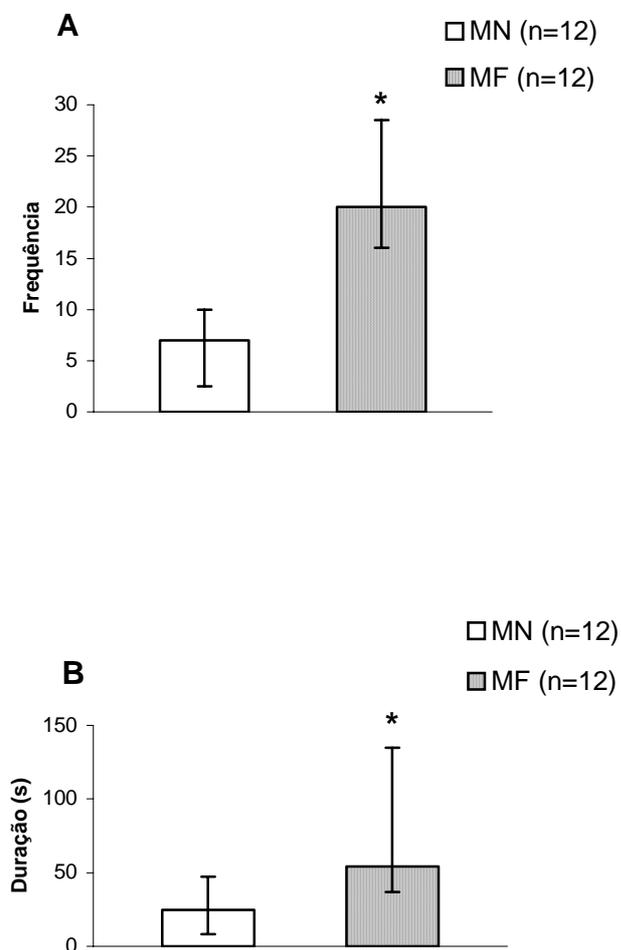


Figura 12. Comportamento de cheirar os genitais da fêmea receptiva. Em A e B tem-se respectivamente a frequência e a duração de cheirar os genitais. Os ratos foram observados durante 30 minutos ou até o término do período refratário referente a primeira ejaculação. *Diferença significativa comparando os animais MF em relação aos irmãos MN. Os resultados foram expressos pela mediana (intervalo interquartil) e analisados através do teste de Wilcoxon para $p \leq 0,05$ de significância.

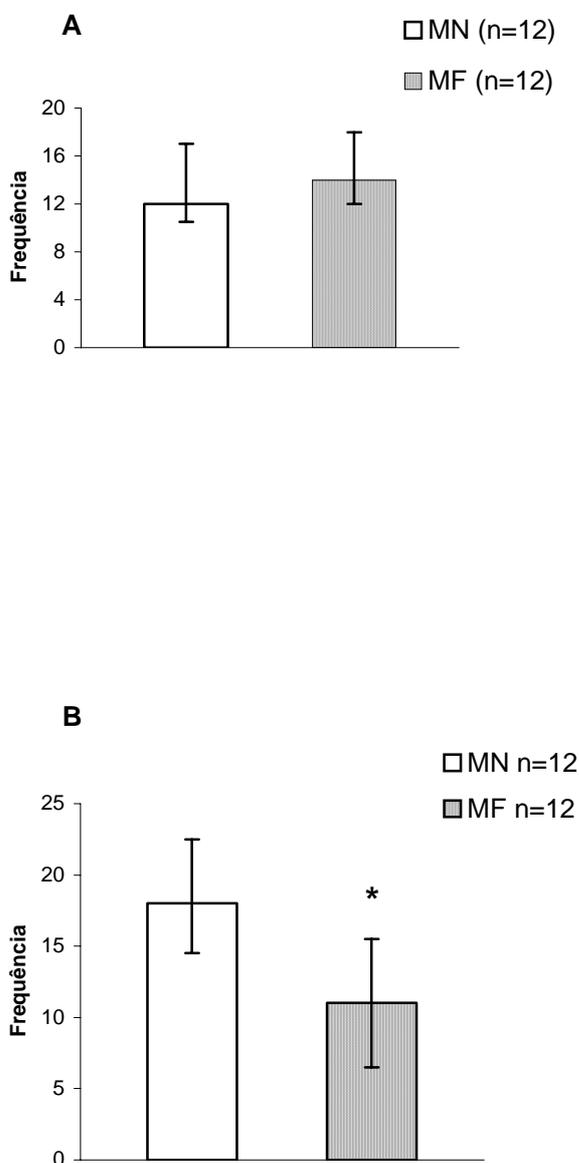


Figura 13. Comportamento de montar a fêmea receptiva. Em A e B tem-se respectivamente a frequência de monta e a frequência de intromissão. Os ratos foram observados durante 30 minutos ou até o término do período refratário referente a primeira ejaculação. *Diferença significativa comparando os animais MF em relação aos irmãos MN. Os resultados foram expressos pela mediana (intervalo interquartil) e analisados através do teste de Wilcoxon para $p \leq 0,05$ de significância.

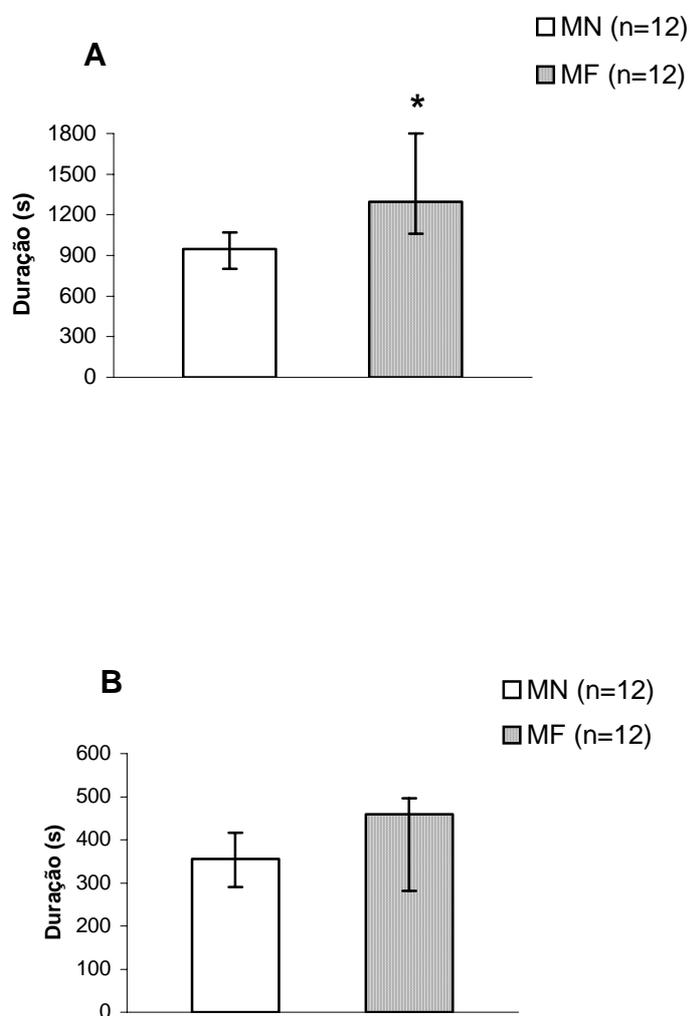


Figura 14. Latência de ejaculação (A) e período refratário (B) do comportamento sexual de ratos machos. Os ratos foram observados durante 30 minutos ou até o término do período refratário referente à primeira ejaculação. *Diferença significativa comparando os animais MF em relação aos irmãos MN. Os resultados foram expressos pela mediana (intervalo interquartil) e analisados através do teste de Wilcoxon para $p \leq 0,05$ de significância.

4. Comportamento de memória social

Em relação aos resultados do comportamento de reconhecimento e interação social, nos referimos ao teste de memória social dos animais machos na idade adulta. Quando dissermos que os registros (R), no caso R3 e R4 forem significativamente menores que o R5, neste experimento realizado, estamos nos referindo que esses animais reconheceram os dois intrusos juvenis a que foram expostos.

Os resultados no comportamento de investigação social nos ratos machos MN e MF sem experiência sexual, mostraram que não houve efeito entre os grupos na frequência de cheirar juvenis (Figura 15-A) [$F(1,22) = 0,002$; $p = 0,96$], e também não houve interação entre grupo e registros [$F(4,88) = 1,39$; $p = 0,24$]. Porém a ANOVA seguida de Newman-Keuls, mostrou que a frequência de cheirar o juvenil no registro R3, é menor comparada aos registros R1 e R5 e que a frequência de cheirar o juvenil no registro R4, é menor comparada aos registros R1, R2, R3 e R5. Não houve diferenças significativas entre os registros R1, R2 e R5.

Quando analisamos a duração de cheirar os juvenis (Figura 15-B) nos machos MN e MF sem experiência sexual, os resultados mostraram que não houve efeito entre os grupos na duração de os cheirar juvenis [$F(1,22) = 1,86$; $p = 0,185$], e também não houve interação entre grupo e registros [$F(4,88) = 0,60$; $P = 0,66$]. Porém a ANOVA seguida de Newman-Keuls, mostrou que a duração de cheirar o juvenil no registro R3, é menor comparada aos registros R1, R2 e R5 e que a duração de cheirar o juvenil no registro R4, é menor comparada aos registros R1, R2, R3 e R5. Não houve diferenças significativas entre os registros R1, R2 e R5.

Os resultados no comportamento de investigação social nos ratos machos MN e MF sem experiência sexual, na Figura 16-A mostraram-nos que não houve efeito entre os grupos na frequência de perseguir os juvenis [$F(1,22) = 0,184$; $p = 0,671$], e também não houve interação entre grupo e registros [$F(4,88) = 0,84$; $p = 0,49$].

Porém a ANOVA seguida de Newman-Keuls, mostrou que a frequência de perseguir os juvenis nos registros R2 e R3 , é menor comparada aos registros R1 e R5 e que a duração de cheirar o juvenil no registro R4, é menor comparada aos registros R1, R2 e R5. Não houve diferenças significativas entre os registros R2 e R5.

Em relação à duração de perseguir os juvenis (machos sem experiência sexual), a figura 16-B mostrou-nos que não houve efeito entre os grupos na duração de perseguir os juvenis [$F(1,22) = 0,50$; $p = 0,486$], e também não houve interação entre grupo e registros [$F(4,88) = 0,45$; $p = 0,76$]. Porém a ANOVA seguida de Newman-Keuls, mostrou que a duração de perseguir os juvenis nos registros R2 e R5 , foi menor comparada aos registros R1 e que a duração de perseguir o juvenil no registro R3 e R4 foi semelhante entre sí, porém menores quando comparadas aos registros R1, R2 e R5. Não houve diferenças significativas entre os registros R2 e R5.

Novamente os resultados no comportamento de investigação social nos ratos machos MN e MF após adquirirem experiência sexual, mostram-nos de acordo com a Figura 17-A que não houve efeito entre os grupos na frequência de cheirar os juvenis [$F(1,22) = 1,74$; $p = 0,20$], e também não houve interação entre grupo e registros [$F(4,88) = 1,28$; $p = 0,28$]. Porém a ANOVA seguida de Newman-Keuls, mostrou que a frequência de cheirar os juvenis nos registros R2 e R3, foi menor comparada aos registros R1 e que a duração de cheirar o juvenil no registro R4, é menor comparada aos registros R1, R2, R3 e R5. Não houve diferenças significativas entre os registros R2, R3 e R5.

A figura 17-B, mostrou-nos que os ratos machos MN e MF com experiência sexual apresentaram efeito entre os grupos na duração de cheirar os juvenis [$F(1,22) = 5,20$; $p = 0,03$], porém não houve interação entre grupo e registros [$F(4,88) = 0,83$; $p = 0,50$]. Além disso, a ANOVA seguida de Newman-Keuls, mostrou que a duração de cheirar os juvenis nos registros R3 foi menor comparada aos registros R1, R2 e R5 e que a duração de cheirar o juvenil no registro R4, é menor comparada aos

registros R1, R2, R3 e R5. Não houve diferenças significativas entre os registros R1, R2 e R5.

A figura 18, representa os ratos machos MN e MF com experiência sexual analisados quanto a frequência e duração de perseguir os juvenis. Os resultados mostram-nos que houve efeito entre os grupos na frequência de perseguir (Figura 18-A) os juvenis [$F(1,22) = 5,285$; $p = 0,024$], porém não houve interação entre grupo e registros [$F(4,88) = 1,03$; $p = 0,39$]. Além disso, a ANOVA seguida de Newman-Keuls, mostrou que a frequência de perseguir o juvenil no registro R2 foi menor comparada aos registros R1 e R5 e que a frequência de perseguir o juvenil no registro R4, foi menor comparada aos registros R1, R2 e R5. Não houve diferenças significativas entre os registros R1 e R5, nem entre os registros R3 e R4. Porém, em relação à duração de perseguir os juvenis, a figura 18-B mostra-nos que não houve efeito entre os grupos na duração de perseguir os juvenis [$F(1,22) = 0,20$; $p = 0,65$], e também não houve interação entre grupo e registros [$F(4,88) = 1,06$; $p = 0,37$]. Porém, a ANOVA seguida de Newman-Keuls, mostrou que a frequência de perseguir o juvenil no registro R2 e R3 foi menor comparada aos registros R1 e R5 e que a frequência de perseguir o juvenil no registro R4, foi menor comparada aos registros R1, R2 e R5. Não houve diferenças significativas entre os registros R1 e R5, nem entre os registros R2 e R3.

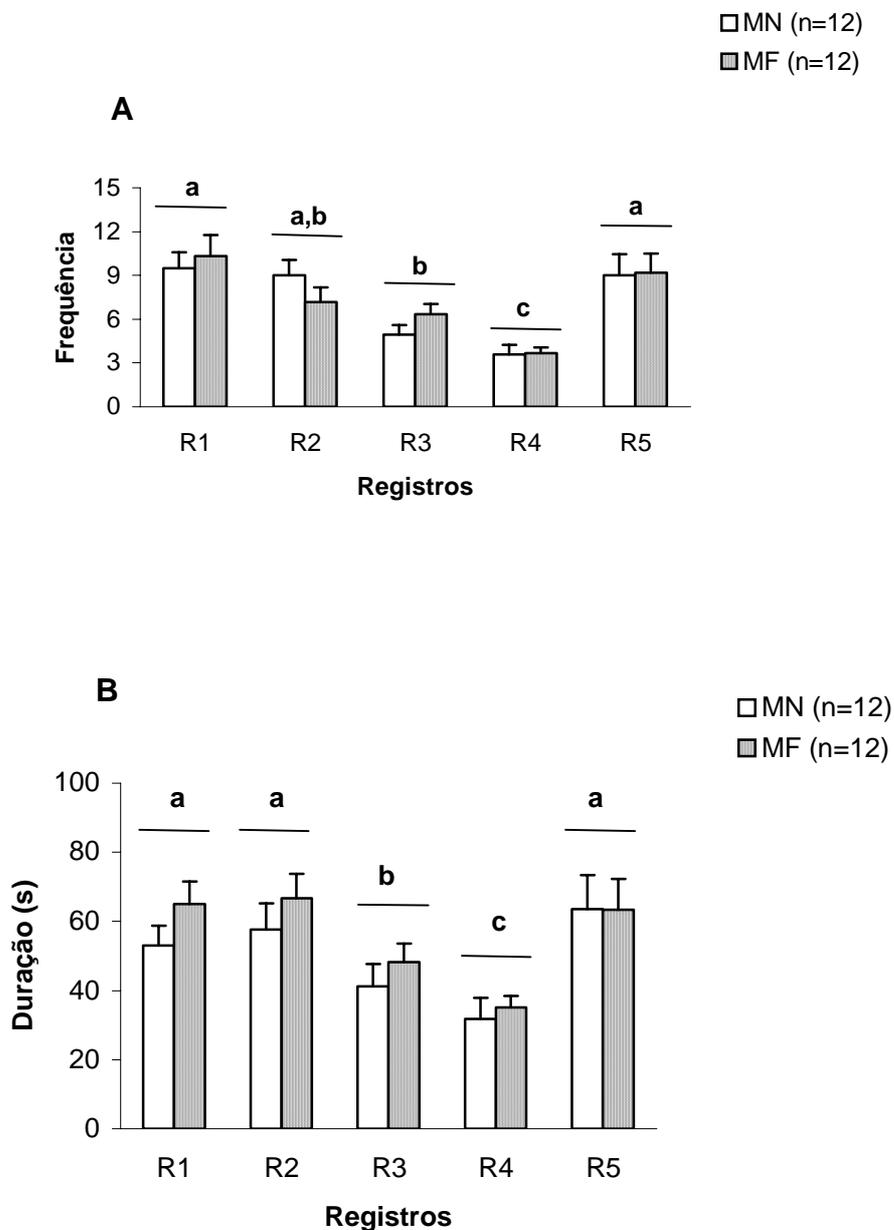


Figura 15. Média (\pm EPM) da frequência (A) e da duração (B) de cheirar o macho intruso juvenil 1 nos registros R1 a R4 e o macho intruso juvenil 2 no registro R5. Os animais não tinham experiência sexual prévia. As letras a, b e c indicam diferenças estatísticas entre os registros (R1 a R5). Não houve diferenças significativas entre grupos. Os resultados foram analisados através do teste estatístico ANOVA seguido de Newman-Keuls para $p \leq 0,05$ de significância.

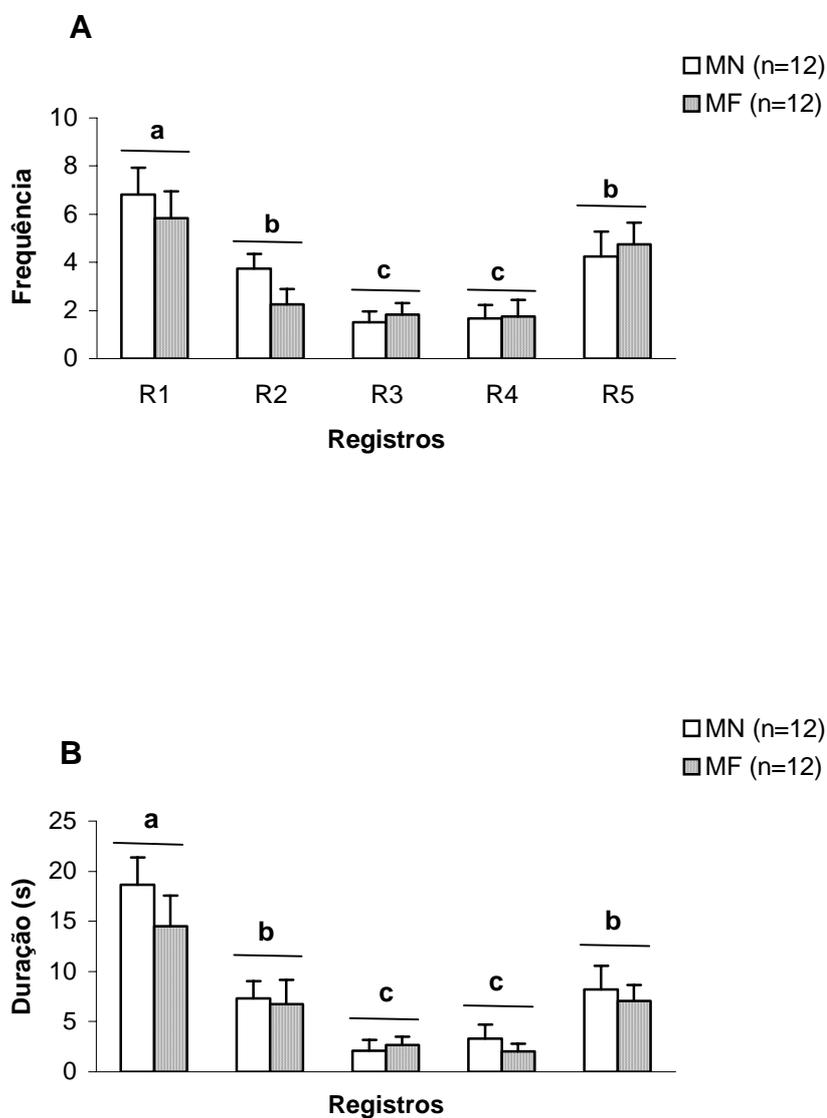


Figura 16. Média (\pm EPM) da frequência (A) e da duração (B) de perseguir o macho intruso juvenil 1 nos registros R1 a R4 e o macho intruso juvenil 2 no registro R5. Os animais não tinham experiência sexual prévia. As letras a, b e c indicam diferenças estatísticas entre os registros (R1 a R5). Não houve diferenças significativas entre grupos. Os resultados foram analisados através do teste estatístico ANOVA seguido de Newman-Keuls para $p \leq 0,05$ de significância.

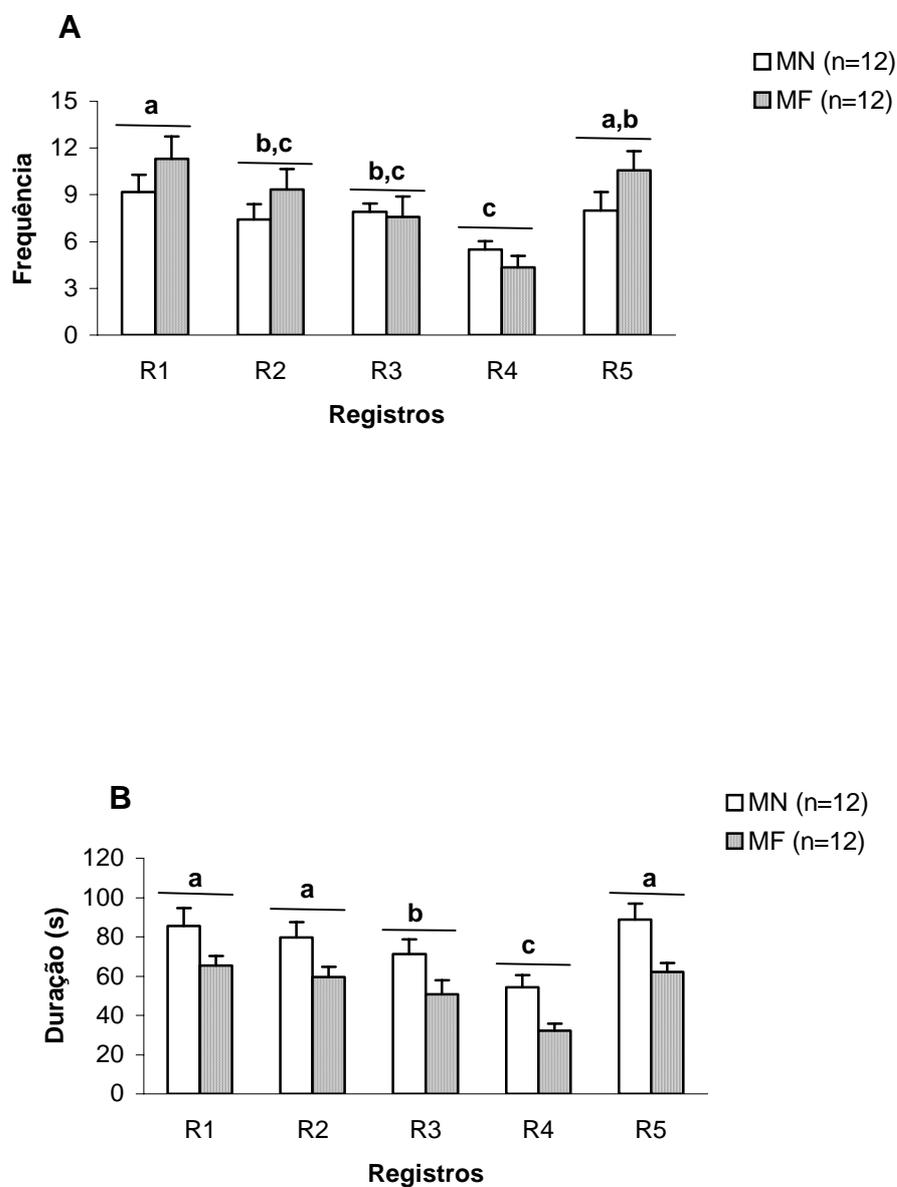


Figura 17. Média (\pm EPM) da frequência (A) e da duração (B) de cheirar o macho intruso juvenil 1 nos registros R1 a R4 e o macho intruso juvenil 2 no registro R5. Os registros foram feitos após os machos adquirirem experiência sexual. As letras a, b e c indicam diferenças estatísticas entre os registros (R1 a R5). Não houve diferenças significativas entre grupos. Os resultados foram analisados através do teste estatístico ANOVA seguido de Newman-Keuls para $p \leq 0,05$ de significância.

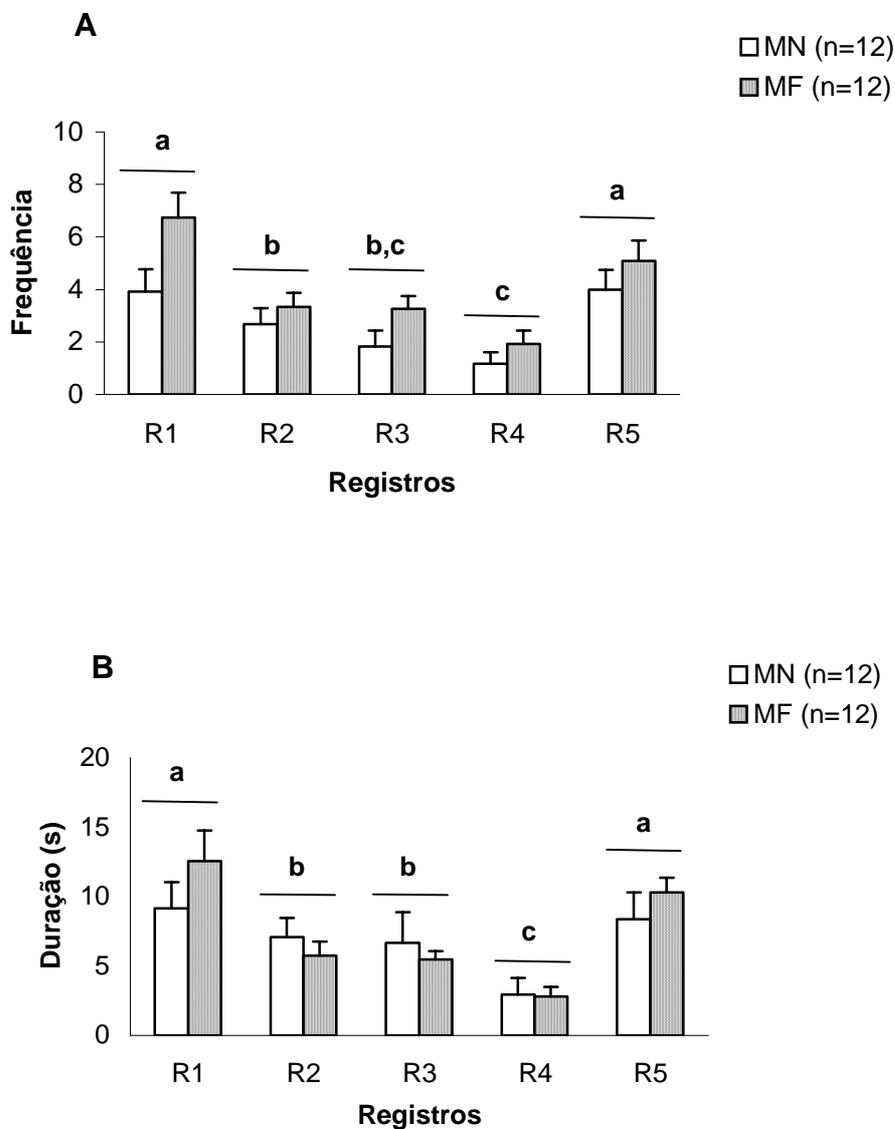


Figura 18. Média (\pm EPM) da frequência (A) e da duração (B) de perseguir o macho intruso juvenil 1 nos registros R1 a R4 e o macho intruso juvenil 2 no registro R5. Os registros foram feitos após os machos adquirirem experiência sexual. As letras a, b e c indicam diferenças estatísticas entre os registros (R1 a R5). Não houve diferenças significativas entre grupos. Os resultados foram analisados através do teste estatístico ANOVA seguido de Newman-Keuls para $p \leq 0,05$ de significância.

5. Resposta da concentração plasmática de prolactina após o estresse de contenção

A figura 19 mostra-nos que não houve efeito entre os grupos em relação ao tempo que os ratos machos permaneceram no tubo contensor [$F(1,16) = 1,73$; $p = 0,20$], e também não houve interação entre os grupos em função do tempo [$F(3,48) = 0,34$; $p = 0,79$]. Porém, a ANOVA seguida de Newman-Keuls, mostrou que a concentração plasmática de prolactina está significativamente aumentada após 2 minutos de estresse por contenção em relação ao estado basal desses animais [$F(3,48) = 4,34$; $p < 0,001$]. No entanto, não há diferenças significativas entre os tempos 2, e 5 minutos entre os animais manipulado no ninho e manipulado fora do ninho mas após 15 minutos de contenção a concentração plasmática de prolactina diminui aos níveis basais

A figura 20 mostra-nos o resultado do cálculo da área abaixo da curva sobre a concentração plasmática de prolactina indicando que nos animais manipulados no ninho a concentração de PRL ($224,5 \pm 38,10$) é significativamente maior em relação aos machos irmãos manipulados fora do ninho ($66,5 \pm 11,64$) pelo teste t de Student $p < 0,001$.

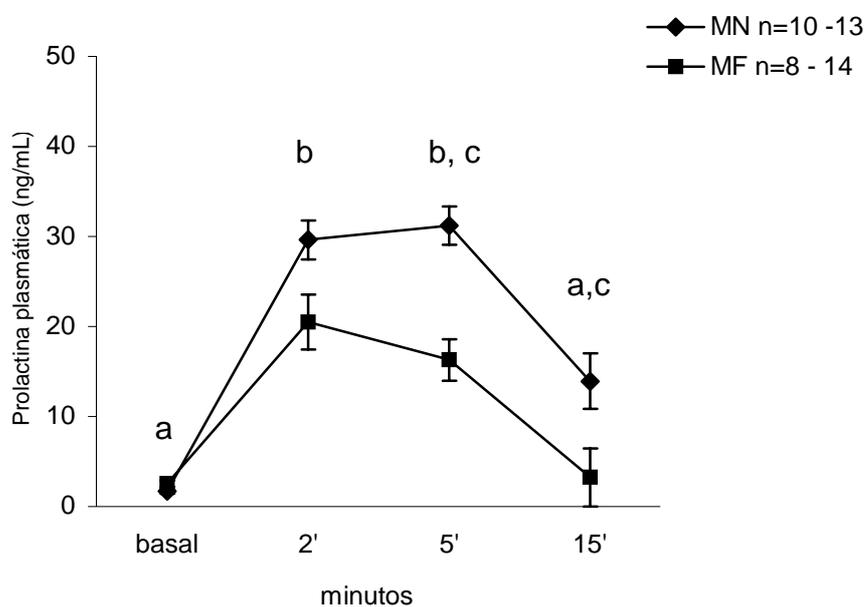


Figura 19. Efeito do estresse de contenção em ratos machos adultos sobre a concentração plasmática de prolactina. Média (\pm EPM) da concentração plasmática de prolactina (ng/mL) de ratos manipulados no ninho (MN) e manipulados fora do ninho (MF) no período neonatal e na idade adulta tiveram o sangue da veia jugular externa coletado na situação basal e após 2, 5 e 15 minutos de estresse por contenção. As coletas de sangue iniciaram-se às 14 horas no ciclo claro. As letras a, b e c indicam diferenças estatísticas entre os registros (R1 a R5). Não houve diferenças significativas entre grupos. Os resultados foram obtidos através da ANOVA seguida pelo teste de Newman-keuls para $p \leq 0,05$.

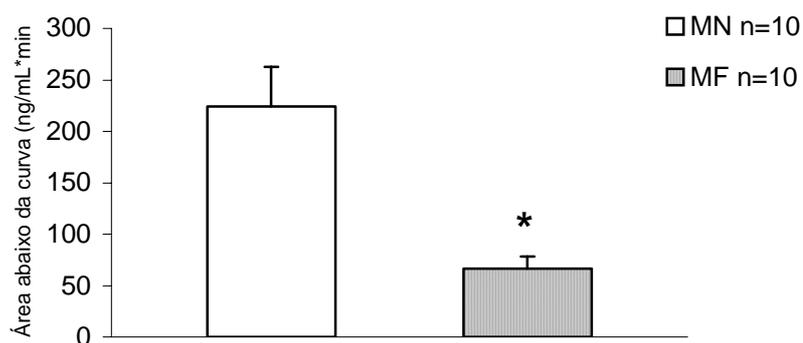


Figura 20. Área abaixo da curva da concentração plasmática de prolactina em ratos machos adultos submetidos ao estresse de contenção. Média (\pm EPM) da concentração plasmática de prolactina (ng/mL) de ratos manipulados no ninho (MN) e manipulados fora do ninho (MF) no período neonatal e na idade adulta tiveram o sangue da veia jugular externa coletado durante estresse por contenção. As coletas de sangue iniciaram-se às 14 horas no ciclo claro. *Os resultados foram obtidos através do teste t de Student para $p \leq 0,05$ de significância.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, nós usamos os termos “MN” para se referir aos ratos que foram manipulados no ninho ou seja na caixa residência e “MF” para se referir aos ratos que foram manipulados fora da caixa residência, no novo ambiente e quando nos referimos à manipulação neonatal, estamos inferindo a estimulação táctil dos filhotes.

Nossos resultados mostram que a exposição dos filhotes ao novo ambiente não altera o comportamento maternal entre os filhotes irmãos de cada ninhada, mas provoca uma menor inibição comportamental em machos adultos quando expostos a ambientes novos como o campo aberto, além de diminuir o comportamento sexual em machos, promove uma diminuição nas concentrações plasmáticas de prolactina quando mantidos em estresse por contenção. Além disso, esses animais foram capazes de reconhecer a presença de diferentes intrusos na sua caixa residência quando testados no comportamento de reconhecimento e interação social, mostrando uma habituação em relação às sucessivas exposições ao mesmo intruso juvenil.

Um outro modelo experimental, derivado, mas diferente dos procedimentos de manipulação neonatal realizado por Levine e Denenberg têm sido usado para verificar algumas modificações no comportamento de ratos. Neste modelo, TANG, (2001) colocou metade dos filhotes de cada ninhada brevemente em um novo ambiente (3 min.), enquanto a outra metade da ninhada permanecia sem contato com o experimentador. Esse procedimento permitiu estudar o comportamento desses animais na idade adulta eliminando importantes fatores biológicos e ambientais no período neonatal como a privação maternal e a manipulação neonatal.

O comportamento maternal realizado no presente trabalho, também sofreu uma adaptação do procedimento feito por TANG (2001), pois além de expormos metade dos filhotes de cada ninhada a um novo ambiente com maravalha nova também introduzimos a estimulação táctil em todos os filhotes da ninhada e, observamos o comportamento maternal de lambe os filhotes nos dias 1, 5 e 10 pós-

parto. Nosso objetivo foi verificar se o comportamento maternal é imprescindível para as respostas comportamentais dos animais na idade adulta, ou se pode não ser o principal componente dessa interação mãe-filhote.

Trabalhos prévios mostram que as mudanças comportamentais e neuroendócrinas encontradas nos animais adultos, provavelmente se devem as variações no comportamento maternal entre os irmãos que nunca saíram do ninho em relação aos expostos ao novo ambiente no período neonatal. Portanto, seus resultados estão atribuídos incondicionalmente à exposição de metade das ninhadas ao novo ambiente e não ao possível aumento do comportamento maternal para os filhotes que foram expostos a um novo ambiente no período neonatal (TANG, 2001; TANG et al., 2002; TANG et al., 2003; TANG et al., 2005).

Ao analisarmos o comportamento maternal evidenciamos que a mãe não aumentou o cuidado maternal com os filhotes manipulados fora do ninho em relação aos seus irmãos que foram manipulados no ninho. Esse resultado nos permite sugerir que a ruptura do convívio familiar no período neonatal promoveu alterações comportamentais nos animais adultos indicando que há outros fatores além do comportamento maternal que são responsáveis por essas alterações comportamentais na idade adulta. O comportamento maternal de lambar os filhotes nesse experimento não confirmou os resultados obtidos por FRANCIS et al. (1999); LIU et al. (1997) e CHAMPAGNE & MEANEY (2001) que, apesar de utilizarem métodos diferentes de registro do comportamento maternal em relação ao nosso procedimento, verificaram que a manipulação e o breve afastamento dos filhotes (15 minutos) aumenta o cuidado materno logo após o retorno dos filhotes ao ninho.

Apesar de observarmos o comportamento maternal somente nos dias 1, 5 e 10 pós-parto e cada sessão de registro ser feita por um único e ininterrupto período de 30 minutos imediatamente após os filhotes MF e a mãe retornarem a caixa residência, poderíamos prever um aumento no comportamento maternal para os filhotes MF. Talvez a frequência de registros e o número de dias de observação do

comportamento maternal não tenha sido suficiente para mostrar-nos um aumento no cuidado maternal, porém acreditamos não ter sido este o fator responsável pela semelhança no cuidado materno observado em nossos resultados entre os filhotes irmãos de cada ninhada.

A semelhança do cuidado maternal entre os irmãos MN e MF pode ser atribuída a alguns fatores. Primeiramente a exposição de metade dos filhotes de cada ninhada a um novo ambiente pode não ter sido um estímulo suficientemente intenso nestes animais para que a mãe aumentasse o comportamento de lambar comparado aos filhotes que permaneceram no ninho. Esta possibilidade pode ser considerada pois comprovadamente, nos experimentos em que se faz intervenções em toda a ninhada, os filhotes aumentam as vocalizações em resposta ao rompimento na relação mãe-filhote tendo como resultado o aumento no comportamento maternal (CALDJI, 1998).

Um segundo fator a ser considerado é o fato de que todos os filhotes de cada ninhada foram manipulados e possivelmente os efeitos da manipulação neonatal podem ser mais consistentes e se sobrepõem aos efeitos da breve exposição a um novo ambiente, fazendo com que a mãe dispensasse a mesma frequência e duração do comportamento de lambar os filhotes em toda a ninhada.

Se considerarmos que durante a exposição dos filhotes neonatos a um novo ambiente o procedimento experimental também incluiu a retirada da mãe da caixa residência e que ao retornar, a mãe encontrou toda a ninhada (com dois procedimentos experimentais diferentes) reunida no ninho, podemos inferir um terceiro fator, talvez o mais provável, que foi a incapacidade da mãe em distinguir quais foram os filhotes manipulados no ninho em relação aos seus irmãos manipulados fora do ninho, apresentando portanto o mesmo perfil comportamental de lambidas para toda a ninhada.

Nós não podemos atribuir ao cuidado materno a responsabilidade em promover as alterações comportamentais no campo aberto descritas até agora pois, o comportamento maternal não foi diferente entre os irmãos manipulados no ninho e

dos manipulados fora do ninho. Também não podemos atribuir essas diferenças comportamentais à manipulação neonatal pois todos os filhotes de cada ninhada foram manipulados, eliminando esta variável do experimento. Portanto, a ruptura do convívio familiar pela exposição dos filhotes a um novo ambiente durante o período neonatal parece ser o agente causador em diminuir o medo de ratos machos adultos testados no campo aberto avaliados neste trabalho.

Muitos trabalhos têm mostrado a relevante relação entre a manipulação neonatal e o comportamento maternal como responsáveis por induzir as alterações comportamentais, neuroendócrinas e estruturais classicamente estudadas. Certamente a manipulação neonatal altera permanentemente o eixo HPA em resposta a uma variedade de estímulos estressores (PRYCE & FELDON, 2003; PRYCE et al., 2001; CALDJI et al., 2000; LEVINE, 1994; PLOTSKY & MEANEY, 1993; LEVINE, 1964) como descrito anteriormente.

Ratos manipulados no período neonatal durante as duas primeiras semanas de vida exibem uma menor secreção plasmática de ACTH, corticosterona e prolactina (PRL) durante uma situação de estresse e apresentam um rápido retorno as concentrações basais após o término do estresse (PLOTSKY & MEANEY, 1993; SEVERINO et al., 2004). Além disso, LEVINE (1964), já relatava que ratos manipulados no período neonatal exibiam quando adultos uma maior exploração no ambiente, sendo mais ativos, defecando e urinando menos no campo aberto e confirmado mais tarde por PRYCE & FELDON (2003), indicando que esses animais são emocionalmente menos responsivos a uma situação estressante quando adultos (LEVINE, 1964).

A manipulação neonatal também diminui a inibição comportamental de machos e fêmeas em um ambiente aversivo como o campo aberto com o predador (PADOIN et al., 2001). VILLESAS et al. (1977), verificou que os filhotes removidos do ninho por um breve período de 3 minutos, na idade adulta apresentavam uma frequência maior

de "rearing" além de defecarem menos no campo aberto quando comparados aos animais não manipulados.

Considerando que o aumento na atividade exploratória desses animais no campo aberto seja uma medida da diminuição do medo, TANG (2001); TANG et al., (2003) também verificou que os animais jovens (22 dias de vida) que foram expostos a um novo ambiente no período neonatal quando testados no campo aberto já apresentavam respostas de diminuição do medo. Mais recentemente descobriu-se que a desinibição comportamental no campo aberto em animais expostos a um novo ambiente durante 3 minutos no período neonatal é dependente do sexo, ou seja, quando comparados os machos e fêmeas que nunca saíram do ninho, em contato contínuo com o ambiente familiar, as fêmeas apresentam uma menor reatividade emocional com maior atividade no campo aberto. Quando machos e fêmeas foram expostos a um novo ambiente, rompendo o convívio familiar foram os machos que apresentaram uma maior atividade no campo aberto quando comparados às irmãs fêmeas (TANG et al., 2003).

Em nossos resultados, os machos manipulados fora do ninho também possuem menos medo que seus irmãos manipulados no ninho quando testados no campo aberto, mostrando que nossos resultados concordam com a literatura. Porém, o fato desses animais permanecerem mais tempo no centro do campo aberto pode representar um fator de risco, pois, mesmo não havendo um predador neste teste comportamental, se inferirmos que este animal em um ambiente natural apresentasse as mesmas características comportamentais, os animais MF estariam mais susceptíveis ao ataque de um predador. Portanto, o aparente benefício da exposição a um novo ambiente ou da manipulação neonatal em causar uma diminuição do medo nestes animais, se contrapõe aos prejuízos na integridade física do animal por se tornar uma presa fácil no ambiente natural.

Nos adultos o efeito do estresse diminui a atividade sexual e a capacidade reprodutiva, tanto de machos como de fêmeas em várias espécies animais

(CHROUSOS et al., 1998). Considerando que a ruptura do convívio familiar possa representar uma situação estressante para o filhote no período neonatal, testamos o comportamento sexual dos animais manipulados no ninho e os manipulados fora do ninho na idade adulta e um outro importante resultado deste estudo foi à redução do comportamento sexual dos animais manipulados fora do ninho em relação aos irmãos manipulados no ninho. Estudos em nosso laboratório mostraram que a manipulação neonatal promove ciclos anovulatórios em fêmeas (GOMES et al., 1999) e animais manipulados possuem uma diminuição no comportamento sexual quando adultos (GOMES et al., 1999; 2005; PADOIN et al., 2001). PADOIN et al., (2001) no entanto, verificaram que esta diminuição do comportamento sexual é mais pronunciada em machos sem experiência sexual previa, ou seja machos virgens; e que a experiência sexual pode reverter parcialmente este prejuízo melhorando o desempenho desses animais na atividade sexual.

Nós registramos o comportamento sexual somente em machos adultos com aproximadamente 100 dias de vida e sem experiência sexual prévia, e constatamos que os animais MF mostraram uma diminuição no comportamento sexual quando comparados aos irmãos MN. Portanto, o ninho parece fornecer uma proteção importante para o filhote contra essas alterações comportamentais na idade adulta, ou atenuando-as e que a ruptura do convívio familiar induz a um efeito deletério na diminuição do comportamento sexual dos machos que foram manipulados fora do ninho no período neonatal.

Outros dados interessantes de nosso trabalho mostraram que os irmãos manipulados no ninho e manipulados fora do ninho diminuem o comportamento de investigação social após sucessivas exposições ao mesmo intruso juvenil, mas quando expostos a outro intruso, aumentam a duração e frequência de investigação, ou seja voltam a cheirar e perseguir o juvenil como um estranho. Esses resultados se repetiram independente dos machos serem virgens ou experientes sexualmente,

evidenciando sua aptidão em aprender e memorizar a qual juvenil estavam sendo expostos.

A habituação é a forma de aprendizagem na qual o animal adquire informações sobre as propriedades de um novo estímulo, à medida que o estímulo se torna repetido (KANDEL et al., 1997). Um animal inicialmente responde a um novo estímulo com uma série de comportamentos como demonstrado em nossos resultados quando os machos MN e MF foram inicialmente expostos aos intrusos juvenis. No entanto, se o estímulo não for reforçador, nem lesivo, o animal aprende a suprimir sua resposta a esse estímulo. Essa supressão aprendida da resposta é chamada de habituação (KANDEL., 1997) e através desse mecanismo podemos explicar a diminuição na investigação dos machos MN e MF quando expostos sucessivas vezes ao mesmo intruso juvenil.

Nos trabalhos que foram feitos relacionando a manipulação neonatal com a memória social nos animais adultos mostrou-se que a estimulação tátil ou a exposição ao novo ambiente têm um impacto neste parâmetro comportamental analisado que implica no aumento da memória social desses animais estimulados em relação aos não estimulados (TANG et al., 2003)

Mais recentemente, TANG et al. (2005), utilizando o modelo no qual metade dos filhotes de cada ninhada foi simplesmente exposta a um novo ambiente enquanto a outra metade permanecia no ninho sem contato direto com o experimentador comparou os irmãos no teste de reconhecimento social em dois períodos da vida, quando tinham 7 semanas e quando tinham 7 meses de vida. Nas duas idades os machos expostos ao novo ambiente mostraram uma maior habituação ao intruso juvenil comparados aos que permaneceram no ninho. Embora não tenhamos verificado as concentrações plasmáticas de nenhum hormônio que possivelmente estivesse envolvido com os comportamentos de interação e memória social, alguns estudos mostram que apesar da corticosterona (CORT) ser classicamente considerada um hormônio do estresse, o aumento da memória social pode ser atribuído à

diminuição na concentração basal desse hormônio (TANG et al., 2003). Essa inter-relação entre CORT e reconhecimento social sugere que este hormônio seja um forte candidato a modular a memória social pois os animais expostos a um novo ambiente no período neonatal, apresentaram uma habituação mais rápida frente à exposição de um intruso e paralelamente tiveram uma redução na concentração plasmática de CORT quando testados na idade adulta (TANG et al., 2003).

Certamente outros hormônios também estudados estão envolvidos no reconhecimento social como a ocitocina e a vasopressina e podem agir modulando a memória social por múltiplos sistemas neurohormonais. No entanto, se relacionarmos que a exposição dos filhotes no período neonatal ao novo ambiente promove uma mudança no eixo HPA, e que o aumento na locomoção dos machos no campo aberto e que a modulação da memória social estão vinculados a estas mudanças neuroendócrinas, a diminuição na concentração plasmática de CORT dos animais expostos ao novo ambiente (TANG et al., 2003) explicariam esses resultados.

Buscando encontrar uma possível explicação endócrina para a redução na reatividade ao estresse que não fosse a participação direta da CORT, mensuramos a concentração plasmática de outro hormônio liberado em situações de estresse, a PRL. Como descrito anteriormente em nossos resultados, os irmãos MN e MF apresentam um aumento na secreção de PRL quando submetidos ao estresse de contenção em relação aos níveis basais, indicando que esses animais respondem ao estresse. Outra observação importante é que após 15 minutos de estresse os níveis de PRL nos machos MN e MF retornam aos níveis basais. Esse resultado concorda com os resultados encontrados em animais estressados por éter (SEVERINO et al., 2004). O mesmo estudo mostra-nos que quando ratos machos manipulados foram submetidos ao estresse por éter na idade adulta, a concentração plasmática de PRL foi menor até 15 minutos após o estresse em relação aos ratos não manipulados mas, não diferindo no estado basal (SEVERINO et al., 2004).

Ratos que foram expostos a um novo ambiente no período neonatal quando tiveram os níveis de PRL mensurados na idade adulta imediatamente após uma situação de estresse (exposição do animal no campo aberto), esses animais mostraram uma menor concentração plasmática de PRL em relação aos animais intactos indicando neste teste uma menor amplitude na ativação da secreção de PRL (NÚÑEZ et al., 1996), como consequência de uma exposição a um ambiente estressante. Esses dados concordam com os resultados da concentração de PRL analisados através do cálculo da área abaixo da curva encontrados neste trabalho, de que os machos MF possuem uma menor concentração desse hormônio em relação aos machos irmãos MN.

De fato, há poucos estudos correlacionado a manipulação neonatal ou exposição neonatal a um novo ambiente com a resposta da PRL ao estresse. No entanto, a ruptura do convívio familiar afeta a liberação de PRL em resposta ao estresse por contenção (NÚÑEZ et al., 1996) talvez pela ativação do CRH em resposta ao estresse, uma vez que o CRH facilita a liberação de PRL (AKEMA et al., 1995) e que animais manipulados possuem uma menor síntese e liberação de CRH durante o estresse (VIAU et al., 1993).

A PRL secretada em resposta ao estresse depende dos níveis encontrados antes do estresse, ou seja, quando os níveis de PRL forem baixos antes do estresse, o estresse aumenta a PRL no plasma. Em contraste, quando no pré-estresse os níveis basais forem altos, o estresse induz a uma marcada redução na PRL plasmática, evidenciando finalmente que a secreção de PRL mostra um estado dependente do estresse (DONADIO et al., 2004). Portanto se considerarmos os valores plasmáticos da PRL encontrados em nossos animais, e que a manipulação neonatal e a exposição a um novo ambiente tem mostrado uma cascata de mudanças fisiológicas, neuroanatômicas nos animais adultos (TANG., 2003), podemos inferir que a ruptura do convívio familiar verificada nos machos MF promove mudanças no eixo HPA que

resulta em uma redução da concentração de PRL nestes animais em resposta ao estresse.

O presente estudo examinou portanto os efeitos que a breve ruptura do convívio familiar pode causar nos indivíduos na idade adulta. Certamente os estímulos aplicados afetaram as relações sociais desses animais no período neonatal causando marcas que perduraram ao longo da vida do animal e repercutem em seus comportamentos como foi descrito e analisado previamente.

Os resultados mostrados neste trabalho somam-se a décadas de estudos em que se aplicaram diferentes procedimentos experimentais para verificar quais os mecanismos atuantes nas intervenções promovidas na relação mãe-filhote estariam contribuindo para os efeitos comportamentais encontrados na idade adulta destes animais. Metodologicamente nós introduzimos dois procedimentos experimentais para filhotes da mesma ninhada: (1) a estimulação táctil dos filhotes e (2) a exposição de metade dos filhotes a um novo ambiente. Este novo método permitiu-nos mostrar que a saída dos filhotes do ninho mesmo que por breves intervalos diários nas duas primeiras semanas de vida foi suficiente para promover efeitos que persistem na vida do animal adulto em uma variedade de situações.

CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que a mãe representa um componente primordial no desenvolvimento dos filhotes para as respostas comportamentais aos estímulos estressores, porém não é o único.

O ninho parece fornecer uma proteção importante contra possíveis alterações comportamentais nos animais adultos.

As alterações comportamentais resultantes da exposição ao novo ambiente no período neonatal aparentemente independem da estimulação táctil dos filhotes.

A ruptura do convívio familiar pela exposição ao novo ambiente durante o período neonatal diminui o medo de ratos machos adultos testados no campo aberto.

Às variações do ambiente dos neonatos pela ruptura do convívio familiar induz a diminuição no comportamento sexual desses animais na idade adulta.

A ruptura do convívio familiar promove uma menor secreção de PRL nestes animais, mostrando uma menor reatividade ao estresse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMARIO, A.; PERELLO, A.; LOPEZ-CALDERON, A. Adrenocorticotropin administration increases testosterone secretion in adult male rats. **Life Science**. V. 39, p. 1119-1122, 1986.

AKEMA, T.; CHIBA, A.; OSHIDA, M.; KIMURA, F.; TOYODA, J. Permissive role of corticotropin-releasing factor in the acute stress-induced prolactin release in females rats. *Neuroscience Letters*. V. 198, p. 146-148, 1995.

BATESON, P.; BARKER, D.; CLUTTON-BROCK, T.; DEB, D.; D'UDINE, B.; FOLEY, R. A.; GLUCKMAN, P.; GODFREY, K.; KIRKWOOD, T.; LAHR, M. M.; McNAMARA, J.; METCALFE, N.; MONAGHAN, P.; SPENCER, H. G.; SULTAN, S. E. **Developmental plasticity and human health**. (Hypothesis). *Nature*. V. 430, p. 419-421, 2004.

BIAGINI, G.; PICH, E. M.; CARANI, C.; MARRAMA, P.; AGNATI, L. F. Postnatal maternal separation during the stress hiporresponsive periods enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. **International Journal of Developmental Neuroscience**. V. 16, p. 187-197, 1998.

BIRKE, L. I. A; SADLER, D. Differences in maternal behavior of rats and the sociosexual development of the offspring. **Developmental Psychobiology**. V. 20, p. 85-99, 1987.

BREDY, T. W.; GRANT, R. J.; CHAMPAGNE, D. L.; MEANEY, M. J. Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. **European Journal of Neuroscience**. V. 18, p. 2903-2909, 2003. (Short communication)

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 95, p. 5335-5340, 1998.

CALDJI, C.; FRANCIS, D. 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, p. 219-229, 2000.

CHAMPAGNE, F. C.; MEANEY, M.J. Like mother, like daughter: evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress responsivity. **Progress in Brain Research**. V. 133, p.287-301, 2001.

CHAMPAGNE, F. C.; 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 & Behavior**. V. 79, p. 359-371, 2003.

CHARMANDARI, E., TSIGOS, C., CROUOS, G. Endocrinology of the stress responses. **Annual Review Physiology**. V. 67, p. 259- 284, 2005.

CHROUSUS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress system disorders-overview of physical and behavioral homeostasis. **Jama**. Vol. 267, p. 1244-1252, 1992.

CHROUSOS GP; TORPY DJ; GOLD PW. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. **Ann. Intern. Med.** V. 129, p. 229-240, 1998.

CLAYTON, C. J.; GROSSER, B. I.; STEVENS, W. The ontogeny of corticosterone and dexamethasone receptors in rat brain. **Brain Research.** V. 134, p. 445-453, 1977.

CIRULLI, F.; ALLEVA, E.; ANTONELLI, A.; ALOE, L. NGF expression in the developing rat brain: effects of maternal separation. **Developmental Brain Research.** 123: 129-134. 2000.

CIRULLI, F.; BERRY, A.; ALLEVA, E. Early disruption of the mother-infant relationship: Effects on brain plasticity and implications for psychopathology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.** V. 26. p. 73-82, 2003.

DARNAUDÉRY, M.; BARBAZANGES, A.; KHOEL, M.; CABIB, S.; MOAL, M.; MACCARI, S. Early and later adoptions differently modify mother-pup interactions. **Behavioral Neuroscience.** V. 118, p. 590-596, 2004.

DENENBERG, V. H.; MORTON, J. R. C. Effects of environment complexity and social groupings upon modification of emotional behavior. **Journal of Comparative Physiology.** V. 55, p. 242-246, 1962.

DENENBERG, V.H.; WHIMBEY, A. E. Infantile stimulation and animal husbandry: A methodological study. **Journal of Comparative Physiology and Psychology.** V. 56, p. 877-878, 1963.

DENENBERG, V. H.; SMITH, S.A. Effects of infantile stimulation and age upon behavior. **Journal of Comparative Physiology and Psychology**. V. 56, p. 307-312, 1963.

DENT, W.G.; SMITH, M. A.; LEVINE, S. Rapid induction of corticotrophin releasing hormone gene transcription in the paraventricular nucleus of the developing rat. **Endocrinology**. V. 141(5), p. 1593-1598, 2000.

DeVRIES, A. C.; GLASPER, E. R.; DETILLION, C. E. Social modulation of stress responses. **Physiology & Behavior**. V. 79, p. 399-407, 2003.

DONADIO, M. V. F.; SAGAE, S. C.; FRANCI, C. R.; ANSELMA-FRANCI, J. A.; LUCION, A. B.; SANVITTO, G. L. Angiotensin II receptors in the arcuate nucleus mediate stress-induced reduction of prolactin secretion in steroid-primed ovariectomized and lactating rats. **Brain Research**, (1006) p.59-65, 2004.

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

FRANCIS, D. D.; MEANEY, M.J. Maternal care and development of stress responses. **Current Opinion in Neurobiology**. V. 9 (1), p. 128-134, 1999. (a)

FRANCIS, D. D.; DIORIO, J.; LIU, D.; MEANEY, M.J. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. **Science**. V. 286, p. 1155-1158, 1999. (b).

FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; ESCORIHUELA, R. M.; DRSCOLL, P.; TOBEÑA, A.; BATTIG, K. Infantile (handling) stimulation and behavior in Young roman high and low avoidance rats. **Physiology and Behavior**. V. 50, p. 563-565, 1991.

GOMES, C. M.; FRANTZ, P. J.; SANVITTO, G. L.; ANSELMO-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. V.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; FRANCI, C.R.; SANVITTO, G. L.; LUCION, A. B. Neonatal handling and reproductive functions in female rats. **Journal of Endocrinology**. Vol. 184, p. 435-445, 2005.

GOULD, E. The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. **Annual of the New York Academy Of Sciences**. V. 743, p. 73-92, 1994.

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

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

ERICK R. KANDEL.; JAMES H. SCHWARTZ.; THOMAS M. JESSELL. **Fundamentos da Neurociência e do Comportamento**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1997.

KOPIN, I. L. Definitions of stress and sympathetic neuronal responses. **Annual New York Academy of Sciences**. V. 771, p.19-30, 1995.

LEVINE, S.; MULLINS, JR. R. F. Hormonal influences on brain organization in infant rats. **Science**. V. 152 (3729): 1589-1591, 1966.

LEVINE, S.; HALTMEYER, G. C.; KARAS, GG.; DENENBERG, VH. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. **Physiology and Behavior**. V. 2, p. 55-59, 1967.

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

LEVINE, S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Annals of the New York Academy of Sciences**. V. 746, p. 275-288, 1994.

LEVINE, S. primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiology and Behavior**. V. 72, p. 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**. V. 277, p. 1659-1662, 1997.

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**. V.60, p. 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 amygdala and frontal

cortex of rats submitted to neonatal stimulation. **29th Annual Meeting of Society for Neuroscience**. p. 617, 1999. (Abstract)

LUCION, A. B.; PEREIRA, F. M. P.; WINKELMAN, E. C.; SANVITTO, G. L.; ANSELMO-FRANCI, J. Neonatal handling reduces the number of cells in the Locus Coeruleus of rats. **Behavioral Neuroscience**. V.117, p. 894-903, 2003.

MACRÍ, S.; MASON, G.; 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**. V. 20, p. 1017-1024, 2004.

a) MEANEY, M.J.; AITKEN, D. H.; BODNOFF, S. R.; INY, L. J.; TARAREWICZ, J. E.; SAPOLSKY, R. M. Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. **Behavior Neuroscience**. V. 99, p. 765-770, 1985.

b) MEANEY, M. J.; SAPOLSKY, R. M.; McEWEN, B. S. The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain: I. Ontogeny and auto regulation. **Developmental Brain Research**. V. 18, p.159-164, 1985.

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 the New York Academy of Sciences**. V. 697, p. 70-85, 1993.

MEANEY, M. J.; DIORIO, J.; FRANCIS, D.; LAROCQUE, S.; O'DONNELL, D.; SMYTHE, J. W.; SHARMA, S.; TANNENBAUM, B. Environmental regulation of the development of

glucocorticoid receptor systems in the rat forebrain. **Annals of the New York Academy of Sciences**. V. 746, p. 260-273, 1994.

MELIA, K. R.; DUMAN, R. S. Involvement of corticotrophin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain Noradrenergic systems. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p.8382-8386, 1991.

MOORE, C. L.; POWER, K. L. Variations in maternal care and individual differences in play, exploration and grooming of juvenile Norway rat offspring. **Developmental Psychobiology**. V. 25, p. 165-182, 1992.

NUMAN, M. Maternal behavior. Em: **The physiology of reproduction**. Ed. Knobil, E. & Neill, J. Raven Press, Ltd., N Y. 1988.

NUÑEZ, J. F.; FERRÉ, P.; ESCORIHUELA, R. M.; TOBEÑA A.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A. Effects of postnatal handling of rats on emotional, HPA axis, and prolactin reactivity to novelty and conflict. **Physiology and Behavior**. 60: 1355-1359, 1996.

OGAWA, T.; MIKUNI, M.; KURODA, Y.; MUNEOKA, K.; MORI, K. J.; TAKAHASHI, K. P. Periodic maternal deprivation alters 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 (4), p. 961-967, 1994.

PADOIN, M.J. Estimulação neonatal, comportamento e desenvolvimento do sistema nervoso no rato wistar. Tese de doutorado apresentada a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

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. **Behavioral Neuroscience**. V. 115, p. 1332-1340, 2001.

PARK, M. K.; HOANG, T. A.; BELLUZZI, J. D.; LESLIE, F. M. Gender specific effect of neonatal handling on stress reactivity of adolescent rats. **Journal of Neuroendocrinology**. V.15, p. 289-295, 2004.

PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic-corticotrophin releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF contents and stress-induced release in adults rats. **Molecular Brain Research**. V. 18, p. 195-200, 1993.

PRYCE, C. R.; BETTSCHEN, D.; FELDON, J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. **Developmental Psychobiology**. V. 38, p. 239-251, 2001.

PRYCE, C. R.; FELDON, J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: effects and mediating mechanisms. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. V. 27, p. 57-71, 2003.

REEB, B. C.; TANG, A. C. Sex difference in temporal patterns of social interaction and its dependence upon neonatal novelty exposure. **Behavioral Brain research**. V. 158, p. 359-365, 2005.

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

RHEES, R. W.; LEPHART, E. D.; ELIASON, D. Effects of maternal separation during postnatal development on male sexual behavior and female reproduction function.

Behavioral Brain Research. V. 123, p. 1-10, 2001.

SAPOLSKY, R.M. The physiological relevance of glucocorticoid endagerment of the hippocampus. *Ann. NT Acad. Sci.* 30: 746:294-304; discussion 304-7, 1994. (Review)

SCHMIDT, M.; ENTHOVEN, L.; Van-WOEZIK, J. H. G.; LEVINE, S.; KLOET, E. R.; OITZL, M. S. The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. **Journal of Neuroendocrinology.** V. 16, p. 52-57, 2004.

SEVERINO, G.; FOSSATI, I. A. M.; PADOIN, M. J.; GOMES, C. M.; TREVIZAN, L.; SANVITTO, G. L.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; LUCION, A.B. 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.** V. 81, p. 489-498, 2004.

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

SWANSON, H. H.; BOLWERK, E.; BRENNER, E. Effects of cooling in infant rats on growth, maturation, sleep patterns and responses to food deprivation. **British Journal of Nutrition.** V. 52, p. 139-148, 1984.

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

TANG, A. C. Neonatal exposure to novel environment enhances hippocampal-dependent memory function during infancy and adulthood. **Learning & Memory**. V. 8, p. 257-264, 2001.

TANG, A. C.; VERSTYNEN, T. Early life environment modulates handedness in rats. **Behavioral Brain Research**. V.131, p. 1-7, 2002.

TANG, A. C.; REEB, B. C.; NAKAZAWA, M. Neonatal novelty exposure affects sex difference in open field disinhibition. **Neuroreport**. V. 14, p. 1553-1556, 2003 a.

TANG, A. C.; REEB, B. C.; ROMEO, R. D.; McEWEN, B. S. Modification of social memory, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and brain asymmetry by neonatal novelty exposure. **The Journal of Neuroscience**. V. 10, p. 8254-8260, 2003.

TANG, A. C.; ZOU, B. Neonatal exposure to novelty enhanced long-term potentiation in CA1 region of the rat hippocampus. **Hippocampus**. V. 12, p. 398-404, 2002.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal-axis, neuroendocrine factors and stress. **Journal of Psychosomatic Research**. V. 53, p. 865-871, 2002.

TODESCHINI, S. A. Efeitos da manipulação e da separação dos filhotes no período neonatal sobre o comportamento da mãe. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2002.

VAN OERS, H. J. J.; DE KLOET, E. R.; WHELAN, T.; LEVINE, S. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress makes is reversed by tactile stimulation and feeding

but not by suppressing corticosterone. **The Journal of Neuroscience**. V. 18(23), p. 10171-10179, 1998.

VIAU, V.; SHARMA, S.; PLOTSKY, P.; MENAËY, M. Plasma ACTH responses to stress in handled and nonhandled rats: differences in stress-induced ACTH levels are associated with increased levels of ACTH secretagogues in the median eminence and occur in response to basal levels of corticosterone. **Journal of Neuroscience**. V. 13, p. 1097-1015, 1993.

VILLESCHAS, R.; BELL, R. W.; KUFNER, M. Effect of handling on maternal behavior following return of pups to the nest. **Developmental Psychobiology**. Vol.10, p. 323-329, 1977.

WARD I. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the Behavior of males. **Science**. V. 175, p. 82-84, 1972.

WALKER, C. C.; PERRIN, M.; VALE W.; RIVIERC. Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. **Endocrinology**. V. 118, p. 1445-1451, 1986.

WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Pituitary corticotrophine function during the stress hiporresponsive period in neonatal rats. **Neuroendocrinology**. V. 57, p. 1003-1010, 1993.

WIGGER, A.; NEUMANN, I. D. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult's rats. **Physiology & Behavior**. V. 66, p. 293-302. 1999.

WINKELMANN-DUARTE, E. C. Alterações morfológicas do sistema nervoso central induzido pela manipulação neonatal. Tese de doutorado apresentada a Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2004.