



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Neurociências

**MODELO DE ESTRESSE MATERNO PERINATAL EM RATOS:
EFEITO SOBRE FILHOTES**

Maiara Lenise Lutz

Porto Alegre/RS
2011



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Neurociências

MODELO DE ESTRESSE MATERNO PERINATAL EM RATOS: EFEITO SOBRE FILHOTES

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

Maiara Lenise Lutz
Orientador: Dr. Aldo Bolten Lucion

Porto Alegre/RS
2011

Assim como acontece em ratos, seres humanos carregam por toda a vida marcas indelévels do que os entes queridos lhes fazem ou deixam de fazer.

Mc Gown

AGRADECIMENTOS

Ao professor Aldo Bolten Lucion pela oportunidade e orientação ao longo de todos esses anos;

Ao PPG Neurociências pela estrutura oferecida;

À CAPES pelo suporte financeiro;

À professora Carmem Juracy Silveira Gottfried pela relatoria;

Ao professor Celso Franci e toda a sua equipe pela cordialidade, acolhimento e oportunidade em realizar parte dos experimentos em seu laboratório;

À professora Carla Dalmaz e à doutoranda Luísa pela cordialidade, acolhimento e oportunidade em realizar a quantificação da ocitocina em seu laboratório;

À professora Matilde Achaval pela paciência e sugestões ao trabalho;

À Paula e demais bioteristas pelo cuidado com os ratos;

Ao Vinícius pelas trocas de turno;

À Márcia Bueno e Silva pela compreensão e ajuda;

Ao laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento, carinhosamente chamado de *lab. 11*, onde desde a época da graduação foi um local de grande enriquecimento científico e pessoal. Muito obrigada a todos aqueles queridos colegas que sempre estiveram dispostos em incentivar, ajudar e discutir os experimentos e a vida como um todo;

À minha mãe que sempre me incentivou a estudar;

Às minhas grandes amigas Malvina e Luciane que me deram apoio e estímulo quando tudo parecia perdido;

Ao Luciano pelo apoio, paciência e estímulo ao longo de todo o mestrado;

Aos ratos, sem os quais esse trabalho não teria sido viável;

E é claro, aos felinos utilizados como modelo de estresse, muito obrigada, Branca, Medéia e nosso grande estressor Ninão pelas horas e horas em que passaram fora de suas casas dentro de uma gaiola sobre as caixas dos ratos.

I. SUMÁRIO

III. Lista de Figuras

V. Lista de Abreviaturas

VI. Resumo

VII. Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A Relação Mãe-Filhote	1
1.2 Resposta ao Estresse	4
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivos Gerais	10
2.2 Objetivos Específicos	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Animais	12
3.1.1 Comitê de Ética em Pesquisa Institucional	12
3.1.2 Fêmeas	12
3.1.3 Filhotes	13
3.2 Procedimentos de Estresse Maternal	15
3.2.1 Procedimento de Estresse Pré-Natal	15
3.2.2 Procedimento de Estresse Pós-Natal	16
3.3 Grupos Experimentais	18
3.4 Experimentos	21
3.4.1 Experimento I: Teste de Preferência Olfatória	21
3.4.2 Experimento II: Concentração de hormônios relacionados com as respostas ao estresse	25
3.4.3 Experimento III: Concentração de ocitocina (OT) no líquido	27
3.5 Descarte dos Animais	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Experimento I	31

4.1.1 Fêmeas	33
4.1.2 Machos	36
4.2 Experimento II	39
4.2.1 Corticosterona	40
4.2.2 Prolactina	41
4.3 Experimento III	42
4.4 Número de Filhotes Vivos por Ninhada	44
5. DISCUSSÃO	45
5.1 Estresse Pré-Natal	47
5.2 Estresse Pós-Natal	48
5.3 Teste de Preferência Olfatória	49
5.4 Concentração de Corticosterona	54
5.5 Concentração de Prolactina	57
5.6 Concentração de Ocitocina Central	59
6. CONCLUSÃO	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8. ANEXO I	72

Lista de Figuras

Figuras

Figura 1. Procedimento de estresse pré-natal	16
Figura 2. Caixas-residência do protocolo de estresse pré-natal	16
Figura 3. Procedimento de estresse pós-natal	17
Figura 4. Gato sobre a caixa residência com a mãe e filhotes.....	17
Figura 5. Esquema do estresse pós-natal	18
Figura 6. Caixa onde foi realizado o Teste de Preferência Olfatória.....	23
Figura 7. Filhote posicionado sobre a linha neutra no início da filmagem	23
Figura 8. Esquema do teste de Preferência Olfatória	24
Figura 9. Filhotes separados por sexo antes do início das coletas	26
Figura 10. Esquema da punção da cisterna magna	27
Figura 11. Punção de filhote onde se observa o líquido fluindo pelo escalpe	28
Figura 12. Esquema da caixa onde é feito o Teste de Preferência Olfatória	50
Figura 13. Ficha utilizada para o registro do comportamento maternal	72

Gráficos

Gráficos 1 a-c. Tempo nas áreas das maravalhas em filhotes fêmeas em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais	33
Gráficos 2. Tempo total de locomoção em filhotes fêmeas em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais	34
Gráficos 3. Frequência de chegada nas áreas contendo maravalhas (limpa ou do ninho) em filhotes fêmeas em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais	34
Gráficos 4. Tempo em que os filhotes fêmeas ficaram em cada uma das duas áreas (área contendo maravalha limpa e área contendo maravalha do ninho) em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais	35

Gráficos 5. Tempo sobre as maravalhas (limpa e do ninho) em filhotes fêmeas em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais	35
Gráficos 6 a-d. Tempo nas áreas das maravalhas em filhotes machos em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais	36
Gráficos 7. Tempo total de locomoção em filhotes machos em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais	37
Gráficos 8. Frequência de chegada nas áreas contendo maravalhas (limpa ou do ninho) em filhotes machos em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais.....	37
Gráficos 9. Tempo em que os filhotes machos ficaram em cada uma das duas áreas (área contendo maravalha limpa e área contendo maravalha do ninho) em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais	38
Gráficos 10. Tempo sobre as maravalhas (limpa e do ninho) em filhotes machos em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais	38
Gráficos 11. Concentração plasmática de corticosterona em filhotes fêmeas em DPN 1 nos diferentes grupos experimentais	40
Gráficos 12. Concentração plasmática de corticosterona em filhotes machos em DPN 1 nos diferentes grupos experimentais	40
Gráficos 13. Concentração plasmática de prolactina em filhotes fêmeas em DPN 1 nos diferentes grupos experimentais	41
Gráficos 14. Concentração plasmática de prolactina em filhotes machos em DPN 1 nos diferentes grupos experimentais	41
Gráficos 15. Concentração líquórica de ocitocina em filhotes fêmeas em DPN 1 nos diferentes grupos experimentais	43
Gráficos 16. Concentração líquórica de ocitocina em filhotes machos em DPN 1 nos diferentes grupos experimentais	43

Tabelas

Tabela 1. Número de filhotes (fêmeas e machos) vivos em DPN 1 em cada grupo amostral em ambos os sexos	44
---	----

Lista de Abreviaturas

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico;

AVP - arginina-vasopressina;

CREB – proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc;

CRH – hormônio liberador de corticotrofina (*Corticotropin-releasing hormone*);

DPN – dia pós-natal;

EPM – erros médios padrões;

HPA – Hipotálamo-Pituitária-Adrenal;

LC - *Locus coeruleus*;

n – número amostral;

PKA – proteína quinase A;

PRL – prolactina;

PrRP - peptídeo liberador de prolactina;

PVN - núcleo paraventricular do hipotálamo;

SNC – sistema nervoso central;

SON - núcleo supra-óptico do hipotálamo.

Resumo

Lutz, Maiara Lenise. **Modelo de Estresse Materno Perinatal em Ratos: Efeito sobre Filhotes**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

Em ratos a mãe é indispensável para a sobrevivência dos filhotes durante as duas primeiras semanas de vida. O comportamento maternal despendido pelas fêmeas tem grande importância para o desenvolvimento adequado dos filhotes. Assim, eventos estressores durante o período perinatal capazes de desencadear perturbações nessa relação podem levar a alterações comportamentais e neuroendócrinas duradouras nesses filhotes.

Nesse trabalho avaliamos o efeito do estresse perinatal sobre a formação do vínculo entre mãe-filhotes e sobre os níveis dos hormônios relacionados com as respostas ao estresse, para tanto, os filhotes foram submetidos à coleta de plasma sanguíneo para a dosagem de hormônios relacionados ao estresse (corticosterona e prolactina) e foram submetidos ao Teste de Preferência Olfatória (teste comportamental) e à dosagem de ocitocina central para avaliar a formação do vínculo mãe-filhote.

O estresse perinatal aqui empregado foi subdividido em estresse pré-natal e estresse pós-natal. No primeiro, a fêmea prenha foi submetida à restrição de maravalha ao longo da última semana de gestação – do 14º ao 21º dia gestacional – e no segundo a ninhada inteira (mãe e filhotes) foi exposta à presença de um predador (gato) no 1º dia pós-parto. Levando em consideração a presença ou ausência desses estressores os filhotes foram divididos em quatro grupos experimentais: *Controle*, *Estresse Pré*, *Estresse Pós* e *Estresse Pré+Pós*.

Em nossos animais, o estresse perinatal, tanto o pré como o pós-natal, foi capaz de desencadear alterações no Teste de Preferência Olfatória no nono dia de vida, alterações estas que podem ser traduzidas como uma perda na capacidade desses animais se direcionarem ao cheiro da mãe. No entanto, a ocitocina central (coletada no primeiro dia pós-parto) que é fortemente relacionada à formação do vínculo mãe-filhote não foi alterada pelo estresse.

Além da alteração no teste comportamental, o estresse perinatal foi capaz de desencadear alterações nos hormônios de estresse (corticosterona e prolactina) em filhotes muito jovens (primeiro dia pós-natal) e, portanto, ainda dentro do período hiporresponsivo ao estresse no qual as respostas ao estresse, assim como todo o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) estão inibidos. No entanto, os efeitos observados nem sempre foram de aumento desses hormônios e nem sempre foram homogêneos entre os gêneros.

Em conclusão, os resultados dessa dissertação apontam para a validade do modelo de estresse perinatal aqui empregado para provocar perturbações no desenvolvimento adequado dos filhotes a ele submetidos, pois ambos os protocolos de estresse empregados (restrição de maravalha e exposição ao predador) mostraram-se eficazes em gerar mudanças tanto na relação mãe-filhotes como nos principais hormônios relacionados com a resposta ao estresse desses filhotes. E as consequências desse modelo de estresse abrangem tanto os filhotes fêmeas como os filhotes machos, embora nem sempre os gêneros tenham respondido da mesma forma aos estresses, o que demonstra que mesmo ainda muito jovens esses animais já podem apresentar respostas diferentes a mesmas situações e estímulos. O curioso desse modelo é que embora o estresse pré-natal tenha tido uma duração mais longa, o estresse pós-natal (estresse agudo) parece ter sido mais eficiente em provocar alterações nesses filhotes, o que demonstra tanto a importância do período pós-parto imediato para o desenvolvimento desses animais como o forte efeito do predador sobre a presa.

Abstract

Lutz, Maiara Lenise. **Model of Perinatal Maternal Stress in Rats: Effects on Offspring.** Dissertation (Master of Science) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

In rats, the mother plays an essential role in offspring survival during the first two weeks of life. Mother behavior is very important for appropriate offspring development. In this sense, stress events during the perinatal period may disturb the relationship between mother and offspring, leading to enduring behavioral and endocrine changes in the newly born rats.

The present study evaluates the effect of perinatal stress on the establishment of a bond between mother and offspring and on hormone levels associated with response to stress. With that aim, levels of hormones associated with stress (corticosterone and prolactin) were analyzed using blood plasma collected from offspring. Also, the olfactory preference test (behavioral test) was conducted and central oxytocin levels were evaluated to test the mother-to-offspring bond.

Perinatal stress challenge was divided into two stages, pre-natal and post-natal stress. In the first, pregnant females were kept in cages without sawdust during the last week of pregnancy (14th to 21st day), while in the second the whole litter (mother and offspring) were exposed to a predator (cat) on the first post-partum day. Considering exposure to stress, four experimental groups were formed: pre-natal stress, post-natal stress, pre- and post-natal stress, control (no exposure to stress factors).

Perinatal stress (pre- and post-natal) influenced the results of the olfactory preference test on the 9th day of life of offspring. These changes manifested as the loss of the ability to detect the mother's smell. However, central oxytocin levels, which are strongly associated to the establishment of a mother-to-offspring bond and was collected on the first day post-partum, remained unaltered during stress challenge.

Apart from the changes observed in the behavioral test, perinatal stress altered corticosterone and prolactin levels in very young offspring (one day old), within the hyporesponsive period, when responses to stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis are inhibited. Nevertheless, the effects observed were not uniform across genders and were not restricted to increased corticosterone and prolactin levels.

In conclusion, the results obtained point to the legitimacy of the perinatal stress model tested to trigger changes in appropriate offspring development of rats. Both stress protocols (absence of sawdust and exposure to a predator) were efficient in altering the mother-to-offspring bond and influencing the main hormones associated with response to stress by this offspring. The model tested affected both male and female offspring, though genders not always responded uniformly to stresses, demonstrating that even at a very tender age these animals may already exhibit different responses to different stimuli. The interesting point in this model is that, though pre-natal stress lasted longer, post-natal stress (acute stress) seemed to have been more efficient in triggering changes, showing the importance of immediate post-partum period in the development of these animals and the strong effect a predator has on its prey.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Relação Mãe-Filhote

Em ratos a mãe é indispensável para a sobrevivência dos filhotes durante as duas primeiras semanas de vida, pois os filhotes de ratos, assim como a maioria dos roedores, nascem altriciais, isto é, são parcialmente imóveis, desprovidos de pelos, surdos e cegos, incapazes de se locomover e de regular sua temperatura (GROTA & ADER, 1969;1974). A mãe é a fonte que garante proteção, temperatura ideal e nutrição para seus filhotes, ocorrendo uma complexa interação entre mãe e filhote. Essa interação é mantida pela mãe durante o desenvolvimento pós-natal, através de estímulos visuais, olfatórios e auditivos relacionados à ninhada (PRYCE *et al.*, 2001). Durante o período de lactação, as mães apresentam comportamento de cuidar dos filhotes e manifestam-no pela busca dos mesmos quando estes se afastam do ninho, pela estimulação da micção por meio da lambida anogenital, pelo posicionamento sobre os filhotes para provê-los de nutrição e calor, pela construção do ninho e por defesa contra intrusos (GROTA & ARDER, 1969; STERN & JOHNSON, 1990; ALBERT & WALSH, 1995). Até aproximadamente o 12º dia de vida é a mãe quem toma a iniciativa de se aproximar dos filhotes. Sendo assim, a variação no cuidado maternal pode ser considerada o diferencial para as experiências sensoriais no desenvolvimento dos filhotes. Após esse período, os filhotes estão aptos a se locomover e a deixar o ninho, a partir de então passa a serem eles que se aproximam da mãe para requerer cuidados (GROTA & ARDER, 1974).

Esse cuidado dado pela mãe nos primeiros dias vida é considerado um fator crítico para o desenvolvimento adequado dos mamíferos, alterações nessas interações podem modificar a fisiologia e o comportamento da prole a longo prazo (MEANEY, 2001). A interrupção de estímulos sensoriais providos pela mãe tem efeitos negativos no desenvolvimento da ninhada em muitas espécies (SCHANBERG & KUHN, 1980; PAUK *et al.*, 1986). Assim, as relações

entre mãe-filhote são importantes para o crescimento e desenvolvimento adequados dos mamíferos.

Uma das vias candidatas para explicar como ocorre esse vínculo mãe-filhotes é o sistema ocitocinérgico encefálico cuja atividade está aumentada no período pós-parto, estando relacionado ao alvorecer do comportamento maternal (NEUMANN, 2001; STRATHEARN *et al.*, 2009). Já é bem estabelecido que a ocitocina periférica desempenhe importante papel reprodutivo, sendo particularmente importante para as contrações uterinas durante o parto e para a ejeção do leite na lactação. Essa ocitocina é sintetizada pelos neurônios magnocelulares no núcleo paraventricular (PVN) e supra-óptico (SON) do hipotálamo os quais se projetam para a hipófise posterior e lançam a ocitocina na circulação periférica (GORDON *et al.*, 2010; LIM & YOUNG, 2006).

No entanto, a ocitocina também é produzida pelos neurônios parvocelulares do PVN que se projetam para diversas regiões límbicas, essa ocitocina que permanece dentro do encéfalo (ocitocina central) atua como um neurotransmissor/neuromodulador estando envolvida com a regulação de comportamentos sociais dos animais, sendo em conjunto com a vasopressina (AVP) integrante da circuitaria emocional dos mamíferos inclusive de humanos. (LIM & YOUNG, 2006). Tanto a vasopressina como a ocitocina são peptídeos associados com a emergência de ligações sociais, cuidado parental, regulação do estresse, comunicação social e reatividade emocional, sendo que seus níveis são aumentados em resposta a experiências sensoriais sociais boas como toque e cheiros agradáveis. Receptores de ocitocina fazem parte dos sistemas neurais de recompensa de tal modo que provavelmente confira para o filhote em desenvolvimento uma sensação de segurança que torne gratificante a proteção advinda das relações sociais (FRIES *et al.*, 2005).

A exposição materna a adversidades está associada com duradouras consequências no desenvolvimento cognitivo, comportamental e nas respostas fisiológicas de filhotes de ratos

(LÉONHARDT *et al.*, 2007). Atualmente, usam-se vários tipos de protocolos de estresse materno para se tentar induzir alterações nos filhotes. Em ratos de laboratório, o crônico efeito da manipulação neonatal na relação mãe-filhote tem sido estudado experimentalmente há quase 50 anos, um campo de pesquisa aberto por Seymour Levine (PRYCE *et al.*, 2003).

A importância do período perinatal no desenvolvimento do filhote não está restrita apenas aos roedores. Em humanos, por exemplo, dados epidemiológicos mostram resultados consistentes de que estresse precoce está associado com defeitos na cognição, no desenvolvimento afetivo bem como nas respostas fisiológicas ao estresse (MEANEY & SZYF, 2005) os quais incrementam a suscetibilidade a patologias ao longo da vida (MATTHEWS, 2002). Em humanos, o período pós-parto é um período vulnerável e frequentemente associado ao aparecimento de depressão pós-parto sendo esse risco incrementado pela exposição a eventos estressantes durante a gestação (FEDERENKO & WAHWA, 2004). Além disso, alguns autores sugerem a existência de uma relação entre o estresse psicológico materno e o aumento, nos filhos, da incidência de sintomatologia de esquizofrenia e depressão (WATSON *et al.*, 1999; GUTTELING *et al.*, 2005). Assim, o ambiente materno constitui um dos mais significativos ambientes que um mamífero encontrará ao longo de toda a sua vida (PRYCE *et al.*, 2003), sendo que a relação entre mãe e o infante é possivelmente a mais crítica para o provimento de ótimas condições de desenvolvimento (WALKER *et al.*, 2004).

Para um animal altricial o reconhecimento da mãe é de grande importância para sua sobrevivência já que as condições básicas de sobrevivência estão relacionadas à mãe. O olfato atua de maneira crítica na mediação dessa atração mãe-filhote, pois o reconhecimento da mãe pelo filhote nos primeiros dias pós-parto ocorre pelo aprendizado olfatório (LEON, 1998; SULLIVAN & WILSON, 2003). Em outros tipos de mamíferos, assim como em ratos o aprendizado olfatório ocorre pelo paradigma do condicionamento clássico, onde o pareamento do cuidado maternal (estímulo incondicionado) é associado com o cheiro da mãe (estímulo

condicionado) (LEON, 1998; SULLIVAN, 2003). Em humanos as pistas olfatórias parecem ser particularmente salientes em neonatos, sendo estes capazes de perceber uma séria de estímulos olfatórios, dentre eles os aromas naturais que emanam de suas mães (PORTER, 1999).

Desse modo, logo após o nascimento, quando a mãe lambe o filhote, ela estimula a liberação de noradrenalina do *locus coeruleus* (LC) dos filhotes. Esse neurotransmissor age no bulbo olfatório e promove a preferência pelo odor da mãe. No entanto, para que haja uma efetividade da preferência pelo odor, a noradrenalina do LC deve ser liberada em níveis ótimos. Quantidades muito altas desse neurotransmissor não induzem ao aprendizado por um novo cheiro. Enquanto doses muito baixas também não são efetivas (YUAN *et al.*, 2000), ou seja, a relação dose e resposta segue o padrão de uma curva em U invertida.

No bulbo olfatório a noradrenalina age via receptores adrenérgicos α -1 e β -1 promovendo um aumento da concentração de AMPc, que por sua vez ativa a proteína kinase (PKA). Essa proteína então atua fosforilando diversos substratos intracelulares, entre eles o fator de transcrição CREB (“proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc”), cujo papel tem sido destaque em uma variedade de funções biológicas, incluindo a consolidação de memória e o condicionamento olfativo verificado em neonatos (McLEAN *et al.*, 1999).

Experimentos realizados em nosso laboratório por RAINEKI *et al.*, (2009) mostraram resultados que corroboram a idéia de que o estabelecimento da relação mãe-filhote depende desse condicionamento olfativo.

1.2 Resposta ao Estresse

Estímulos estressores são aqueles que desafiam a homeostase, colocando em ameaça o processo de coordenação fisiológica o qual mantém estável a maior parte dos estados no organismo. Nestas situações de ameaça ou perigo desencadeadas por uma variedade de distúrbios ou estímulos externos ou internos os organismos desencadeiam diversas respostas

adaptativas que visam manter a homeostasia, chamadas de respostas ao estresse. Essas respostas ao estresse habilitam o organismo a enfrentar diferentes tipos de ameaças ou desafios e são constituídas por um complexo conjunto de componentes endócrinos, neurovegetativos e comportamentais (JOHNSTONE *et al.*, 2000; PATIN *et al.*, 2002; RIMA *et al.*, 2009, KJAER, *et al.*, 2010).

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o sistema neurovegetativo simpático são os dois principais sistemas neuroendócrinos envolvidos em integrar as respostas a um estressor e sofrer variações visando a homeostase do meio interno. A ativação do eixo HPA resulta na liberação de cortisol (no caso, por exemplo, de humanos) ou corticosterona (em roedores) pelo córtex da adrenal. O aumento da atividade catecolaminérgica e da ativação deste eixo integrado com diversos outros sistemas neuroendócrinos regula a função vascular e a captação de energia, facilitando as respostas comportamentais adequadas e servindo assim, para manter a homeostase (MEANEY *et al.*, 1993; MEERLO *et al.*, 1999). Para que isto ocorra, os neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo sintetizam e secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina-vasopressina (AVP), que irão atuar ativando a hipófise anterior e promovendo a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este, por sua vez irá promover a secreção de glicocorticóides pelo córtex da adrenal, glicocorticóides estes que servem para regular diversas funções que visam a manutenção dos processos metabólicos básicos e a regulação do organismo em resposta ao estresse (HANDA *et al.*, 1994; HERMAN & CULLINAN, 1997).

Em muitas espécies, o período de lactação representa uma condição fisiológica única que está associada com mudanças comportamentais, metabólicas, na plasticidade morfológica central e em funções neuroendócrinas (WALKER *et al.*, 2004) Assim, em mamíferos, o período logo após o parto é um período diferente na vida tanto das mães como na vida dos filhotes, pois ambos estão em um período em que vários processos ocorrem de modo particular. Um exemplo

disso, é que tanto filhotes como fêmeas lactantes possuem uma resposta diferenciada aos fatores normalmente estressores. Em ratas lactantes há uma inibição da resposta ao estresse, embora a resposta ao estresse gerado por eventos relacionados ao filhote se mantém. Desse modo, em fêmeas lactantes a resposta ao estresse parece voltada a eventos que potencialmente podem colocar em risco os filhotes. Estressores que representam uma ameaça direta ao filhote poderiam providenciar um componente de medo suficiente para eliminar a hiporresponsividade ao estresse e induzir uma potente resposta neuroendócrina e comportamental nas mães lactantes (WALKER *et al.*, 2004). Essas alterações não são exclusivas de ratos, em humanos, por exemplo, mulheres lactantes respondem com aumento de cortisol em resposta a vídeos em que bebês estão em situações de potencial risco as suas integridades físicas. Esse aumento de cortisol não ocorre quando mulheres lactantes assistem a vídeos em que não ocorre essa situação (potencial risco a bebês) enquanto que mulheres não lactantes respondem com aumento de cortisol a esses mesmos vídeos. Essa relação entre mãe-filhote é tão marcante que se postula que não existam os seres mãe e filhote em separados existiria apenas o ente *mãe-filhote*, já que não se poderia ocorrer mãe sem filhote e nem filhote sem mãe.

Em filhotes de mamíferos há um evidente período nos quais as respostas ao estresse estão diminuídas. Em filhotes de ratos esse período se caracteriza pela diminuição da resposta a eventos normalmente estressores em adultos. Há baixas concentrações de corticosterona plasmática, baixas concentrações hipofisiárias de ACTH e baixas concentrações hipotalâmicas de CRH. Assim, estímulos que em adultos normalmente levariam ao aumento de ACTH e consequentemente de glicocorticóides são incapazes de fazê-lo em animais neonatos, poupando o filhote dos efeitos permanentes gerados pela exposição aos glicocorticóides durante o desenvolvimento sobre o crescimento e diferenciação de diversos sistemas, incluindo o sistema nervoso central (SNC). Em ratos, esse período particular se estende ao longo das duas primeiras semanas de vida e é chamado de *Período Hiporresponsivo ao Estresse* (LEVINE, 2001;

SAPOLSKY & MEANEY, 1986). O fim desse período de hiporresponsividade coincide com o início das atividades da amígdala.

Embora os glicocorticóides sejam os principais hormônios avaliados quando se trata de respostas relacionadas ao estresse a prolactina (PRL) também responde aos estímulos estressores. Na verdade, o estresse juntamente com a sucção mamilar e o aumento dos estrógenos são os estímulos mais importantes para a secreção de prolactina. A prolactina é um hormônio peptídico adeno-hipofisiário cuja secreção está sob controle tônico inibitório do eixo hipotálamo-hipofisiário, sendo que a dopamina produzida pelos neurônios tuberoinfundibulares dopaminérgicos possui especial relevância nesse controle tônico inibitório. Em ratos os três subtipos morfológicos de células secretoras de prolactina, os lactotrófos tipo I, II e III são sensíveis a essa inibição gerada pela dopamina (CHRISTIAN *et al.*, 2007). Também em ratos, a exposição aguda a estressores resulta em um aumento nos níveis plasmáticos de prolactina de modo mais precoce e fugaz que da corticosterona: o pico pós-estresse ocorre mais rapidamente e dentro de 15 minutos retorna aos valores basais (WAKABAYASHI *et al.*, 1971).

Estudos sobre as consequências da exposição ao estresse em modelos animais utilizam várias formas de estresse que são menos ou mais próximas dos eventos estressores aos quais essas espécies normalmente são expostas na natureza. Atualmente, há justamente uma procura por modelos de estresse que tentam mimetizar ou que sejam ao menos mais próximos dos eventos estressores que normalmente são impostos na natureza às espécies comumente usadas como animais de laboratório. Nessa linha de pensamento, estressores que interfiram no preparo da fêmea para a chegada dos filhotes podem ser vistos como eventos estressores mais “naturais”. Para as fêmeas prenhas a construção de um ninho para abrigar os futuros filhotes é um evento importante para várias espécies de animais, pois vai ser no ninho que a fêmea vai abrigar, proteger, aquecer e alimentar seus filhotes. A falta de condições para a obtenção de um ninho

razoável é fonte geradora de estresse para a fêmea prenha e é considerada um modelo de estresse psicossocial. Assim, em animais de laboratório modelos experimentais em que a fêmea é colocada em situações onde a construção de um ninho adequado é dificultada (ou até mesmo impedida) se constitui como um modelo de estresse que tenta representar situações estressoras possivelmente encontradas na natureza.

Em espécies que se comportam como presas a exposição ao predador é obviamente um evento naturalmente estressor. Assim, para ratos a exposição a um gato (*Felis catus*) é um evento gerador de robustas respostas ao estresse. A introdução de um gato por quinze minutos em uma colônia de ratos gera profundos impactos nestes animais. Durante mais de trinta minutos estes animais emitem altas taxas de vocalizações de 22 kHz que são entendidas pelos demais ratos como um alarme sinalizador da presença de perigo (BLANCHARD & BLANCHARD, 2003). Em ratos, o efeito desencadeado pelo predador pode ser gerado sem a presença física do predador, basta que haja seu cheiro (APFELBACH, *et al.*, 2005).

O forte efeito dos odores de gato e raposa no comportamento de ratos de laboratório (indivíduos estes não expostos a esses odores há muitas gerações) somente pode ser explicado como sendo uma reação inata. Parece provável que o efeito aversivo do odor de predador somente pode existir se o predador e a presa tenham uma longa história evolutiva em paralelo de modo que a presa torne-se geneticamente pré-disposta a evitar os odores de seus predadores simpátricos (APFELBACH, *et al.*, 2005). Um estudo de BLANCHARD *et al.* (2003) demonstrou que é possível que o odor presente na pele de gatos tenha um efeito ansiogênico mais profundo do que outros odores de gato como fezes e urina: comparando-se esses odores, somente o pano esfregado previamente em um gato foi capaz de produzir condicionamento de medo contextual ao ambiente em que foi apresentado ao odor. E, essas respostas aparentemente não dependem do gênero do predador, para o camundongo ou o rato não faz diferença se o gato

é uma fêmea em estro ou um macho dominante: ambos representam ameaça (APFELBACH, *et al.*, 2005).

OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivo verificar possíveis alterações comportamentais e neuroendócrinas em filhotes fêmeas e machos de ratas estressadas no período perinatal, ou seja, em filhotes de ratas estressadas durante o final da gestação e/o logo após o parto. O modelo utilizado se trata de uma adaptação do protocolo experimental desenvolvido por FENOGLIO *et al.*, (2006) cujo estímulo estressante aplicado em ratas lactantes foi a redução do substrato para a construção do ninho. O estresse por redução de substrato é um estímulo mais próximo ao que pode ocorrer na natureza e está relacionado ao comportamento maternal, pois durante os últimos dias de gestação as ratas já começam a preparar o ninho que será mantido durante toda a lactação. Pretendemos com isso associar o estresse a uma atividade normalmente presente no comportamento maternal. Além disso, no primeiro dia após o parto, a rata foi exposta agudamente a um predador natural (gato – adaptado de PATIN *et al.*, 2002). Assim, o presente protocolo combina estresse materno pré-natal e pós-natal.

Importante salientar que esta dissertação tem como objeto analisar os efeitos do estresse perinatal apenas sobre os filhotes (fêmeas e machos) e não sobre a rata preta que foi estressada. Esta parte dos efeitos sobre a mãe faz parte da dissertação de mestrado do aluno Charles Francisco Ferreira, ou seja, nossos trabalhos ocorreram de modo integrado.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar se no 9º dia pós-parto os filhotes fêmeas e machos dos diferentes grupos experimentais apresentam preferência pelo odor maternal (Teste de Preferência Olfatória). O odor maternal é aqui representado pelo odor da maravalha do ninho.

- ✓ Avaliar a concentração de hormônios plasmáticos relacionados com as respostas ao estresse: verificar a influência do estresse perinatal sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona e prolactina em filhotes fêmeas e machos no 1º dia pós-parto.

- ✓ Avaliar a influência do estresse perinatal sobre a concentração de ocitocina líquórica (ocitocina central) em filhotes fêmeas e machos no 1º dia pós-parto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

3.1.1 Comitê de Ética em Pesquisa Institucional

O comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto número 200795 em 20 de novembro de 2008, reunião número 39, ata número 119.

O mesmo foi aprovado por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

3.1.2 Fêmeas

Foram utilizadas ratas fêmeas adultas não prenhas (aproximadamente 40 dias), da variedade Wistar, provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As mesmas foram transferidas ao biotério setorial do laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento e acondicionadas em caixas-residência com mais três ou quatro fêmeas. Em torno dos 45-50 dias de vida essas ratas entraram no protocolo diário de coleta de secreção vaginal para se determinar com precisão as fases do ciclo estral e conseqüentemente quando estariam sexualmente ativas (proestro). Assim, apresentando-se na fase estral proestro as ratas foram colocadas individualmente em caixas juntamente com um macho sexualmente ativo durante as primeiras horas do período noturno do ciclo. No dia seguinte, a fêmea retornava para sua caixa residência original sendo coletada novamente secreção vaginal para podermos assegurar a prenhez dela através da presença de espermatozóides e a confirmação do estro. Esse monitoramento diário foi feito para que a data do parto pudesse ser prevista com maior precisão, uma vez que as ratas deveriam ser separadas em caixas-residência individuais sete dias antes do parto. Neste ponto as fêmeas foram divididas em dois grandes grupos: o primeiro foi aquele em

que as fêmeas foram para caixas moradias padrões e o outro em que foram para caixas moradias com restrição de maravalha.

3.1.3 Filhotes

Os filhotes podem ser divididos basicamente em três grandes grupos:

- ✓ Filhotes para coleta de plasma: um dia após o nascimento (DPN 1) os filhotes foram decapitados para a coleta de sangue que foi usado para as dosagens hormonais no plasma sanguíneo. Esses animais foram decapitados logo após a retirada de suas mães do ninho, até esse momento eles haviam permanecido com elas em suas caixas residências.

- ✓ Filhotes para coleta de líquido: um dia após o nascimento (DPN 1) os filhotes foram puncionados na cisterna magna para a coleta de fluido cerebrospinal. Esses animais foram puncionados logo após a retirada das mães do ninho, até esse momento eles haviam permanecido com elas em suas caixas residências.

- ✓ Filhotes de Nove dias de vida (DPN 9): os filhotes foram mantidos juntamente com a mãe até o nono dia de vida. Durante este período a manipulação dos mesmos (tanto da mãe quanto dos filhotes) foi minimizada, pois foi analisado o comportamento maternal durante os primeiros oito dias de vida. A única manipulação que se manteve foi aquela necessária para a padronização do número de filhotes no primeiro dia pós-parto (padronizado com 08 filhotes por ninhada). No 9º dia pós-natal foram separados dois filhotes por ninhada (um macho e uma fêmea) que foram utilizados nos protocolos experimentais que

avaliaram o efeito do estresse materno sobre o comportamento de Preferência Olfatória dos filhotes. Estes filhotes foram transferidos para outro compartimento para a realização dos experimentos abaixo descritos. Os demais filhotes das ninhadas foram mantidos com a mãe até o final dos experimentos comportamentais com elas. Os testes comportamentais realizados nas ratas mães foram os seguintes: Teste de Comportamento Agressivo Maternal, Nado Forçado, Labirinto em Cruz Elevado e Campo Aberto (FERREIRA, 2010).

Todos os animais foram mantidos no biotério sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas, com início da fase escura às 17:30 horas. A temperatura do biotério foi mantida constante em torno de 22°C. Todos os animais tiveram livre acesso à água e à comida durante todo o período desta pesquisa.

3.2 Procedimentos de Estresse Maternal

O estresse perinatal a que as mães foram submetidas foi de dois tipos: estresse pré-natal e estresse pós-natal.

3.2.1 Procedimento de Estresse Pré-Natal

Para a realização do procedimento de estresse pré-natal, ratas prenhas com seu período de gestação devidamente confirmado por análises do ciclo estral foram dispostas em caixas-residência com restrição de substrato (maravalha) (protocolo adaptado a partir de FENOGLIO *et al.*, 2006) uma semana antes da data prevista para o parto, permanecendo nessa caixa até o 1º dia após o parto (Fig. 1). Esse protocolo teve como objetivo restringir a capacidade da fêmea em construir um ninho adequado aos seus filhotes, já que as mesmas usam a maravalha para este fim. Aqui ao contrário dos aproximados 120 g que normalmente são colocadas nas caixas-residências foram colocados apenas 20 g de maravalha dispostas sobre uma lâmina de papel filtro de 37,5 cm x 31 cm. A lâmina de papel filtro foi usada para ajudar na absorção da urina na falta de maravalha suficiente para isto (Fig. 2).

Durante o período gestacional, estas fêmeas tiveram a manipulação de suas caixas-residência minimizada, para que o agente estressor “redução de substrato” fosse o principal fator de impacto sobre o comportamento das mesmas. Portanto, suas caixas não foram higienizadas nesta fase (durante os últimos sete dias de gestação). No primeiro dia pós-natal, as fêmeas que foram mantidas para posteriores testes comportamentais voltaram novamente ao padrão comum de higienização das caixas-residência utilizados em nosso laboratório (limpeza das caixas realizada duas vezes por semana até o final do experimento).

Modelo experimental

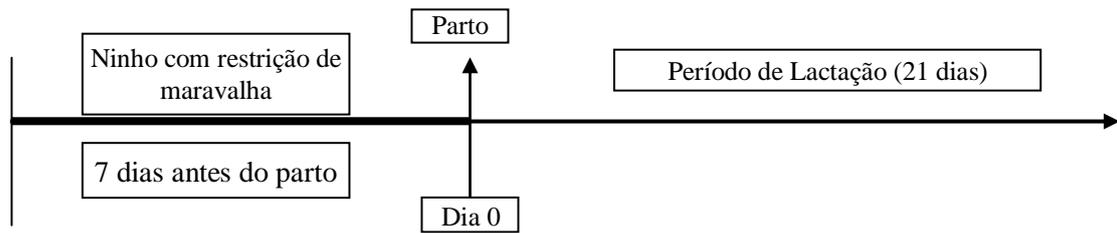


Figura 1. Procedimento de estresse pré-natal.



Figura 2. Caixas-residência do protocolo de estresse pré-natal.

3.2.2 Procedimento de Estresse Pós-Natal

A realização do procedimento de estresse pós-natal ocorreu no primeiro dia pós-parto. No primeiro dia pós-natal (DPN 1) a caixa-residência contendo a fêmea e sua ninhada foi transferida durante o período escuro dos ratos do biotério setorial do laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento para uma sala de experimentos situada no mesmo prédio. A caixa-residência foi então deixada por um determinado tempo nesta nova sala para que a fêmea e os filhotes pudessem se habituar ao novo ambiente. Depois habituados, uma gaiola contendo um gato adulto foi disposta sobre a caixa-residência contendo a fêmea e sua ninhada (Fig. 3 e 4). Esta gaiola foi deixada nesta posição durante 15 minutos. Passados estes

15 minutos a gaiola foi retirada de cima da caixa-residência por 15 minutos para então ser mais uma vez recolocada sobre a caixa-residência por outros 15 minutos (protocolo adaptado de PATIN *et al.*, 2002) (Fig. 5).

Modelo experimental

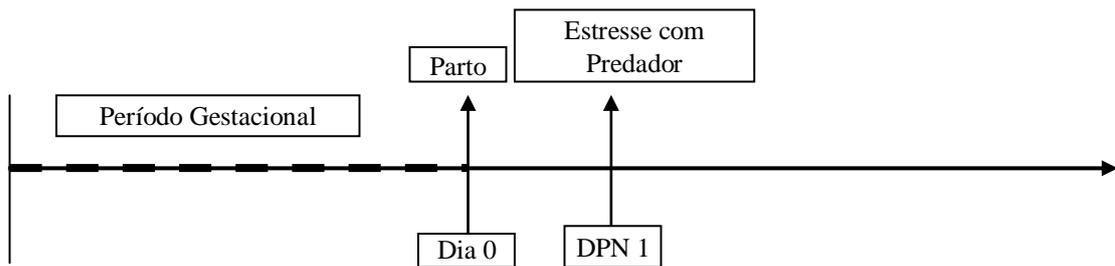


Figura 3. Procedimento de estresse pós-natal.



Figura 4. Gato sobre a caixa residência com a mãe e filhotes. Note na segunda foto no canto direito os filhotes reunidos no ninho.

Modelo Experimental

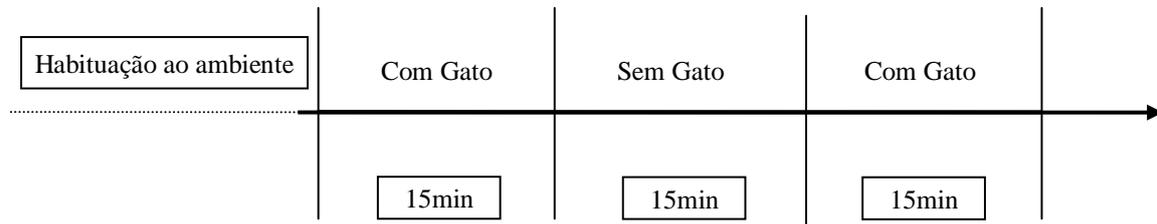


Figura 5. Esquema do estresse pós-natal.

Todos os dados que se referem às mães foram utilizados pelo aluno de mestrado Charles Francisco Ferreira em sua dissertação. A esta dissertação cabe a parte relacionada aos filhotes. Aqui o interesse é observar os possíveis reflexos do estresse materno sobre sua prole.

3.3 Grupos Experimentais

Como já descrito nos materiais e métodos no primeiro e no nono dia após o parto foram retirados filhotes de ninhadas cujas mães passaram ou não pelo estresse perinatal. Os grupos experimentais aqui descritos têm como referencial a presença ou ausência de estresse perinatal sobre as mães (e ninhada no caso do estresse pós-natal). Sobre os filhotes não ocorrerá nenhuma outra intervenção, estando todos os grupos sujeitos aos mesmos protocolos. Desse modo, possíveis diferenças entre os grupos estariam relacionadas à presença/ausência do estresse perinatal materno.

Assim, é necessário primeiro mostrar os diferentes grupos de mães para aí então descrever os grupos experimentais, ou seja, os diferentes grupos de filhotes.

- ✓ **Mães Controle:** ratas fêmeas que tanto ao longo da gestação como após o parto não foram submetidas a nenhum tipo de estresse, estando sujeitas apenas aos procedimentos padrões do biotério.

- ✓ Mães sujeitas ao Estresse Pré-natal: esses animais foram submetidos ao protocolo de estresse por *restrição de maravalha* (Fig. 1).
- ✓ Mães sujeitas ao Estresse Pós-natal: esses animais foram submetidos ao protocolo de estresse por apresentação ao *predador natural* (gato) no dia um pós-parto (Fig. 3).
- ✓ Mães sujeitas ao Estresse Pré e Pós-natal: esses animais foram submetidos ao protocolo de estresse por *restrição de maravalha* e foram apresentadas ao *gato* no dia um após o parto.

A partir destes diferentes grupos de mães os filhotes foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- ✓ Grupo controle (*Controle*): são os filhotes (fêmeas e machos) retirados das ninhadas de *Mães Controle*, ou seja, filhos de ratas que foram colocadas em caixas-residência e não sofreram nenhuma intervenção durante o período perinatal.
- ✓ Grupo estresse maravalha (*Estresse Pré*): são os filhotes (fêmeas e machos) retirados das ninhadas de *Mães sujeitas ao Estresse Pré-natal*, ou seja, filhotes de ratas que foram colocadas em caixas-residência contendo pouco substrato para fazer seu ninho, mas que não foram submetidas ao estresse com predador.
- ✓ Grupo estresse predador (*Estresse Pós*): são os filhotes (fêmeas e machos) retirados das ninhadas de *Mães sujeitas ao Estresse Pós-natal*, ou seja, filhotes de ratas que foram colocadas em caixas-residência cujo substrato não será restringido, mas que no dia um (DPN 1) pós-parto foram submetidas ao estresse com predador.

- ✓ Grupo estresse maravalha-predador (*Estresse Pré+Pós*): são os filhotes (fêmeas e machos) retirados das ninhadas de *Mães sujeitas ao Estresse Pré e Pós-natal*, ou seja, filhotes de ratas que foram colocadas em caixas-residência contendo pouco substrato para construção do ninho durante o período pré-natal e que no dia um (DPN 1) pós-parto foram apresentadas ao predador.

Para todos os grupos descritos anteriormente a idade em que os filhotes foram submetidos aos protocolos experimentais foi de nove dias (DNP 9) para o Teste de Preferência Olfatória e de um dia (DPN 1) para a coleta de plasma sanguíneo e líquido. Considera-se o dia do parto como sendo o dia zero (DPN 0). Para cada ninhada de filhotes foram retirados apenas uma fêmea e um macho para o Teste de Preferência Olfatória, já para a coleta de plasma e líquido foram utilizados todos os animais de cada ninhada devidamente separados por sexo. Assim, utilizamos três grandes grupos de animais: o primeiro para o Teste de Preferência Olfatória, o segundo para a coleta de plasma sanguíneo e o terceiro para a coleta de líquido.

Cabe aqui ressaltar que tanto o protocolo de estresse pós-natal como o teste comportamental e as coletas de plasma e líquido foram realizadas durante o ciclo escuro dos animais, uma vez que ratos são animais de hábitos tipicamente noturnos e queríamos, na medida do possível, tentar chegar mais próximo do que pode acontecer na natureza.

3.4 Experimentos

3.4.1 Experimento I: Teste de Preferência Olfatória

O teste de Preferência Olfatória foi realizado em uma caixa de acrílico de 34 cm de largura x 40 cm de comprimento x 24 cm de altura (Fig. 6). Essa caixa foi dividida em duas áreas de 19 cm por uma zona neutra de 2 cm. No início de cada teste, 300 mL de maravalha limpa e 300 mL de maravalha do ninho da caixa residência foram colocadas cada uma em um canto de uma ou outra área. Filhotes machos e fêmeas foram colocados na linha que determina a zona neutra, encostado na parede oposta com a região da cabeça voltada para as áreas com maravalhas, conforme mostra a figura 7, de modo que o filhote pudesse escolher entre duas áreas com odores diferentes: odor de maravalha limpa e odor do ninho (impregnado pelo odor materno). O comportamento de cada filhote foi filmado por 1 minuto. Ao fim dessa filmagem a caixa foi limpa com álcool 70% e as maravalhas trocadas de lado, ou seja, onde estava a maravalha limpa foi colocada a maravalha do ninho da caixa residência e onde estava a maravalha do ninho da caixa residência foi colocada a maravalha limpa. Após, o mesmo filhote foi testado novamente. Esse procedimento de troca das maravalhas e novo teste ocorreram cinco vezes com um intervalo de 2 minutos entre os testes, conforme mostra o esquema da figura 8. Os vídeos foram analisados com o auxílio do programa *Noldus Observer* (*Noldus Information Technology*, Holanda), onde se verificou:

- ✓ A preferência entre os lados com diferentes maravalhas (limpa e do ninho) nos diferentes grupos experimentais;
- ✓ O tempo total de locomoção dos filhotes nos diferentes grupos experimentais;
- ✓ A frequência de chegada em ambas as maravalhas (limpa e do ninho) nos diferentes grupos experimentais;

- ✓ O tempo total em que os animais ficaram em cada uma das áreas (área contendo maravalha limpa e área contendo maravalha do ninho) nos diferentes grupos experimentais;
- ✓ O tempo em que os filhotes ficaram sobre cada uma das maravalhas (limpa e do ninho).

Os resultados foram expressos pela soma dos dados (tempo/frequência) nos cinco testes para cada filhote, de modo que cada filhote tem apenas um conjunto de dados ao invés de cinco, totalizando 300 segundos de tempo total para cada animal.

Para o Teste de Preferência Olfatória os dados de ambos os sexos foram expressos pela média \pm EPM e analisados em separados (apenas fêmeas ou apenas machos) utilizando os seguinte testes estatísticos:

- ✓ teste *t* de *Student* quando se comparou dentro de cada um dos quatro grupos experimentais (*Controle*, *Estresse Pré*, *Estresse Pós* e *Estresse Pré+Pós*) de fêmeas e machos o tempo em que esses animais permaneceram de um lado ou outro da caixa (lado com maravalha limpa ou lado com maravalha do ninho);
- ✓ ANOVA (Análise da variância) de uma via seguido de Newman-Keuls como pós-teste quando se comparou a locomoção entre os quatro grupos experimentais (*Controle*, *Estresse Pré*, *Estresse Pós* e *Estresse Pré+Pós*) de filhotes fêmeas e entre os quatro grupos experimentais de filhotes machos;
- ✓ ANOVA de duas vias seguido de Newman-Keuls quando as variâncias foram homogêneas e Kruskal-Wallis com teste de Dunn como pós-teste quando as variâncias foram heterogêneas. Estes testes foram utilizados em fêmeas e

machos (separadamente) quando se comparou parâmetros que envolviam duas interações (grupos X maravalhas).

A homogeneidade entre as variâncias foi testada com o teste de Bartlett. Sempre se considerou uma diferença significativa quando $p < 0,05$.



Figura 6. Caixa onde foi realizado o Teste de Preferência Olfatória.



Figura 7. Filhote posicionado sobre a linha neutra no início da filmagem.

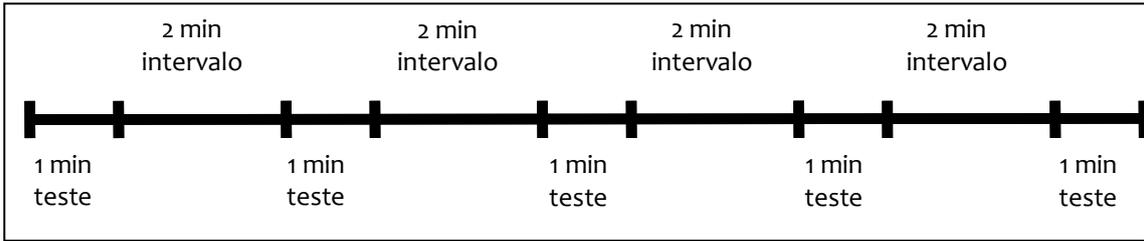


Figura 8. Esquema do teste de Preferência Olfatória.

3.4.2 Experimento II: Concentração de hormônios relacionados com as respostas ao estresse

Em todos os grupos a caixa residência permaneceu no interior do biotério até o início do ciclo escuro do primeiro dia pós-parto (DPN 1) para então ser removida e levada para outras salas. Nos grupos *Controle* e *Estresse Pré* a caixa-residência foi levada diretamente para uma sala anexa ao biotério para os animais serem decapitados rapidamente. Já nos grupos que passaram pelo estresse pós-natal (grupos *Estresse Pós* e *Estresse Pré+Pós*) as caixas-residência foram levadas para a sala onde se deu o estresse pós-natal para logo após os 45 minutos do protocolo de estresse os animais serem decapitados.

Logo antes que os filhotes fossem decapitados as ratas mães foram retiradas do ninho e decapitadas para a coleta de sangue. Em seguida os filhotes foram decapitados e seus sangues coletados através de *ependorfs* previamente heparinizados e mantidos no gelo. Não foram utilizados tubos de ensaio devido ao pouco volume de sangue coletado de cada animal, se fossem utilizados tubos de ensaio boa parte da amostra se perderia escorrendo pelas paredes do tubo. As amostras foram então centrifugadas a 3500 rpm por 20 minutos a 4°C. Aqui cabe ressaltar que apenas com a velocidade de 3500 rpm por 20 minutos é que foi possível separar o plasma sanguíneo dos filhotes, com velocidades mais baixas e por menos tempo como utilizado no sangue das ratas mães (3000 rpm por 15 minutos) não foi possível. Após a centrifugação os plasmas foram retirados e congelados em duplicatas em freezer a -70°C para posterior quantificação dos hormônios por radioimunoensaio. As dosagens foram realizadas no laboratório do Prof. Celso R. Franci na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e os hormônios dosados foram: corticosterona e prolactina.

Tanto na dosagem de corticosterona como na de prolactina foram utilizados um *pool* de animais do mesmo sexo. Assim, em cada ninhada logo após a decapitação das mães os filhotes

foram separados em fêmeas e machos (Fig. 9) e seus sangues coletados em um mesmo *ependorf*, ou seja, cada ninhada resulta em duas amostras de plasma: uma com um *pool* de todas as fêmeas e a outra com um *pool* de todos os machos. Isso teve que ser feito pelo baixo volume de sangue que se consegue extrair de animais com um dia de vida, sendo que isso é ainda mais evidente nas filhotes fêmeas.



Figura 9. Filhotes separados por sexo antes do início das coletas.

Para as dosagens de corticosterona e prolactina os dados de fêmeas e machos foram expressos pela média \pm EPM e analisados em separados utilizando ANOVA de uma via seguido de Newman-Keuls quando as variâncias foram homogêneas e Kruskal-Wallis com teste de Dunn como pós-teste quando as variâncias foram heterogêneas. A homogeneidade entre as variâncias foi testada com o teste de Bartlett. Sempre se considerou uma diferença significativa quando $p < 0,05$.

3.4.3 Experimento III: Concentração de ocitocina (OT) no líquido

Em todos os grupos a caixa residência permaneceu no interior do biotério até o início do ciclo escuro do primeiro dia pós-parto (DPN 1) para então ser removida e levada para outras salas. Nos grupos *Controle* e *Estresse Pré* a caixa-residência foi levada diretamente para uma sala anexa ao biotério para a coleta de líquido, já nos grupos que passaram pelo estresse pós-natal (grupos *Estresse Pós* e *Estresse Pré+Pós*) os animais passaram primeiramente pelo protocolo de estresse para então se proceder à coleta de líquido.

Assim que a caixa-residência era trazida para a sala de coleta a mãe era imediatamente separada dos filhotes e anestesiada para posterior coleta do líquido. Enquanto isso os filhotes eram separados em fêmeas e machos para em seguida serem puncionados. A técnica utilizada para a coleta de líquido foi baseada no protocolo descrito por CONSIGLIO & LUCION (*Technique for collecting cerebrospinal fluid in the cisterna magna of non-anesthetized rats*): os filhotes foram gentilmente segurados com uma das mãos com a cabeça voltada para baixo de tal modo que era possível visualizar a cisterna magna através da transparência da pele, com a outra mão um escalpe (dispositivo para infusão intravenosa) de 27 G foi inserido verticalmente na cisterna magna (Fig. 10).

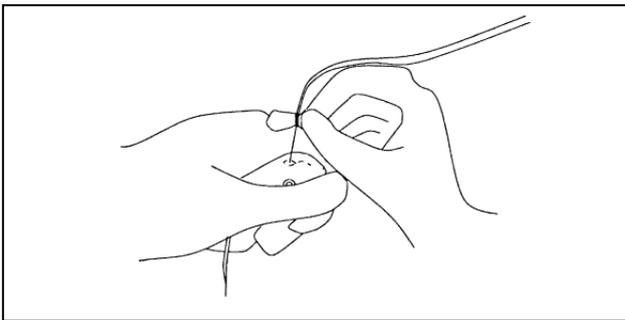


Figura 10. Esquema da punção de líquido da cisterna magna (CONSIGLIO & LUCION, 2000).

Assim que o escalpe era inserido um fluxo de líquido subia espontaneamente por ele, (Fig. 11) em seguida, o escalpe era retirado do animal e sua extremidade colocada dentro de

um *ependorf* para então se acoplar uma seringa na outra extremidade do escalpe. Essa seringa tinha como única função empurrar o conteúdo de dentro do escalpe para dentro do *ependorf*, assim, quando era acoplada já estava com o êmbolo pronto para isso. Logo após a coleta o animal era decapitado.

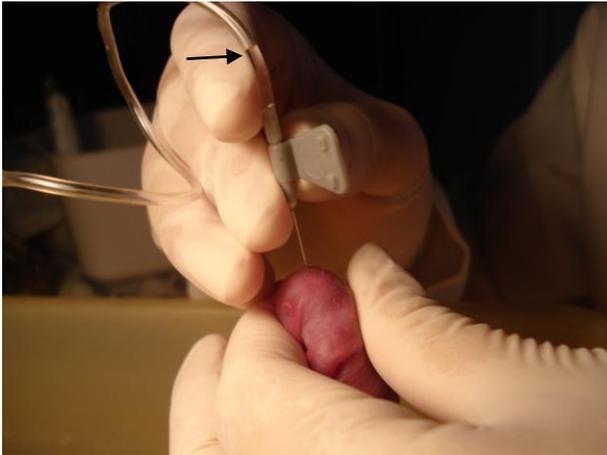


Figura 11. Punção onde se observa o líquido fluindo pelo escalpe (seta).

Assim como nas dosagens de prolactina e corticosterona foi utilizado um *pool* de animais do mesmo sexo. Assim, as amostras de animais do mesmo sexo de uma mesma ninhada foram coletados em um mesmo *ependorf*, ou seja, cada ninhada resultou em duas amostras de líquido: uma com um *pool* de todas as fêmeas e a outra com um *pool* de todos os machos. Isso teve que ser feito pelo baixo volume extraído de animais com um dia de vida, sendo que isso é ainda mais evidente nos filhotes fêmeas. As amostras foram então centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C e estocadas em freezer a -70°C para posterior quantificação da ocitocina pela técnica de Elisa (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) no laboratório da Prof.^a Carla Dalmaz do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Para a dosagem de ocitocina os dados de fêmeas e machos foram expressos pela média \pm EPM e analisados em separados utilizando uma ANOVA de uma via. A homogeneidade entre

as variâncias foi testada com o teste de Bartlett. Sempre se considerou uma diferença significativa quando $p < 0,05$.

3.5 Descarte dos Animais

Após a realização dos testes comportamentais os filhotes foram mortos por decapitação e juntamente com os cadáveres dos animais usados nos testes bioquímicos foram mantidos no freezer setorial do Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento (Instituto Ciências Básicas da Saúde) para então serem encaminhados ao biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para posterior descarte apropriado.

4. RESULTADOS

4.1 Experimento I

Teste de Preferência Olfatória

Para todos os dados relacionados ao Teste de Preferência Olfatória o número de animais por grupo (n) foi:

Grupo Controle Fêmeas: 13;

Grupo Controle Machos: 13;

Grupo Estresse Pré Fêmeas: 15;

Grupo Estresse Pré Machos: 14;

Grupo Estresse Pós Fêmeas: 9;

Grupo Estresse Pós Machos: 11;

Grupo Estresse Pré+Pós Fêmeas: 13.

Grupo Estresse Pré+Pós Machos: 13.

Os gráficos estão expressos em médias \pm erros médios padrões (E.P.M.).

Os resultados desse experimento demonstram que o estresse perinatal aqui empregado foi capaz de desencadear alterações no comportamento dos filhotes de se direcionar ao cheiro da mãe em DPN 9. Quando a preferência olfatória foi analisada dentro de cada grupo experimental sem levar em consideração os demais grupos já foi possível perceber o efeito do estresse pós natal nas fêmeas (Gráficos 1 *c* e 1 *d*) e nos machos (Gráfico 6 *c*).

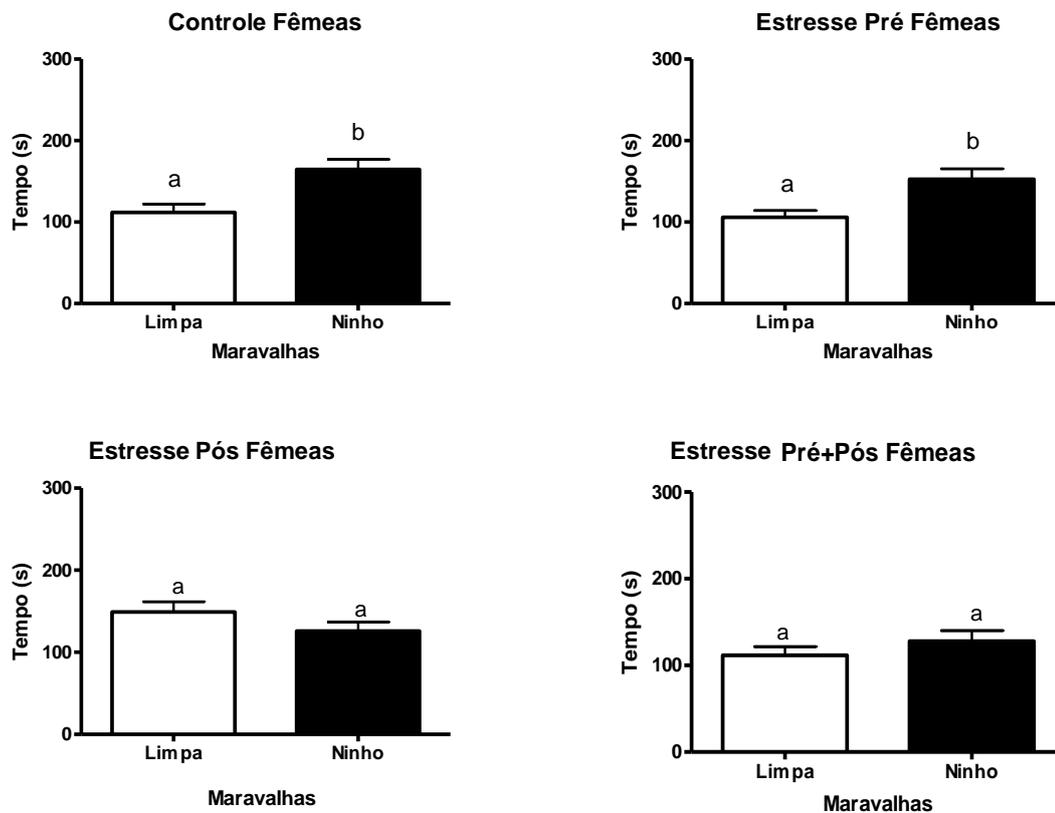
O tempo total de locomoção não foi diminuído pelo estresse perinatal (Gráficos 2 e 7).

A preferência olfatória também foi avaliada comparando-se os quatro grupos de fêmeas entre si e os quatro grupos de machos entre si através tanto da frequência de chegada (Gráficos 3 e 8) como do tempo sobre as áreas (Gráficos 4 e 9) e sobre as maravalhas (Gráficos 5 e 10):

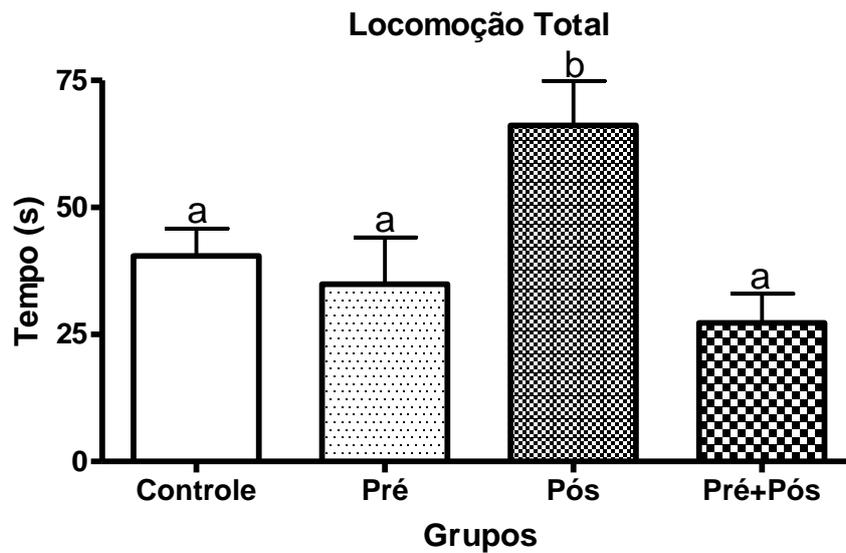
- ✓ A frequência de chegada às maravalhas também indicou o efeito do estresse pós-natal sobre as fêmeas (Gráfico 3), pois as fêmeas dos grupos *Estresse Pós* e *Estresse Pré+Pós* se direcionaram (chegaram) igualmente a ambas maravalhas.
- ✓ O tempo em que os filhotes ficaram sobre as áreas com maravalhas novamente demonstra o efeito do estresse pós-natal sobre fêmeas e também sobre os machos, pois estes animais (grupos *Estresse Pós* e *Estresse Pré+Pós*) permaneceram um tempo semelhante em ambos os lados das caixas (Gráficos 4 e 9).
- ✓ Já o tempo em que esses animais permaneceram diretamente sobre as maravalhas demonstrou um efeito mais amplo do estresse perinatal, uma vez que os animais de todos os grupos submetidos ao estresse (tanto pré como pós-natal) apresentaram tanto em fêmeas como em machos perda da preferência pela maravalha do ninho (Gráficos 5 e 10). No caso dos machos a ausência de preferência do grupo *Controle* talvez possa ser explicada por um erro amostral apontado nas discussões dessa dissertação.

4.1.1 Fêmeas

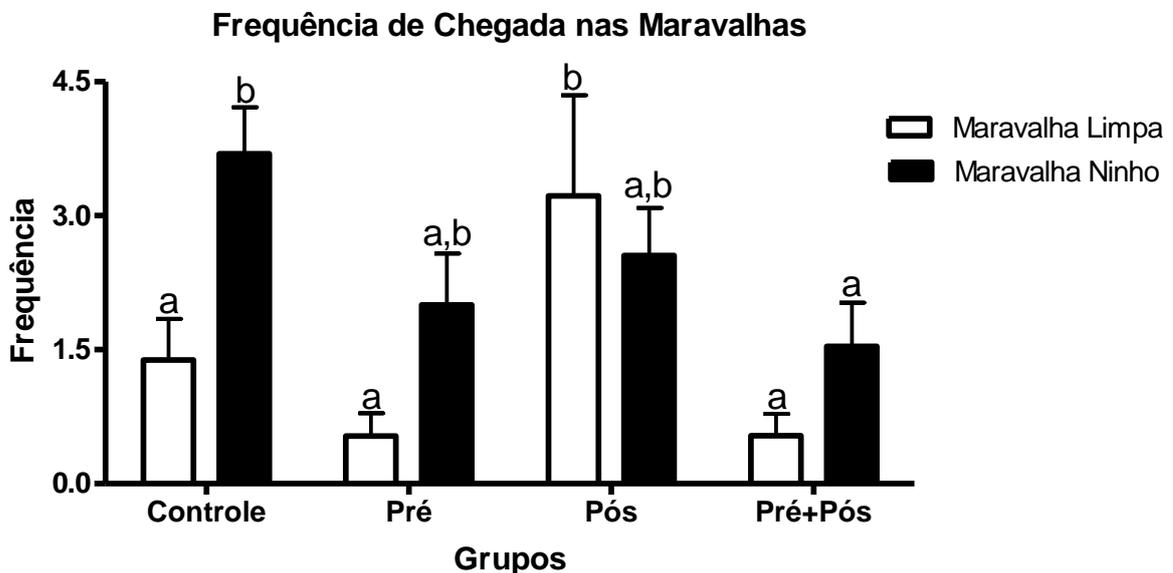
Preferência entre as Maravalhas nos Diferentes Grupos



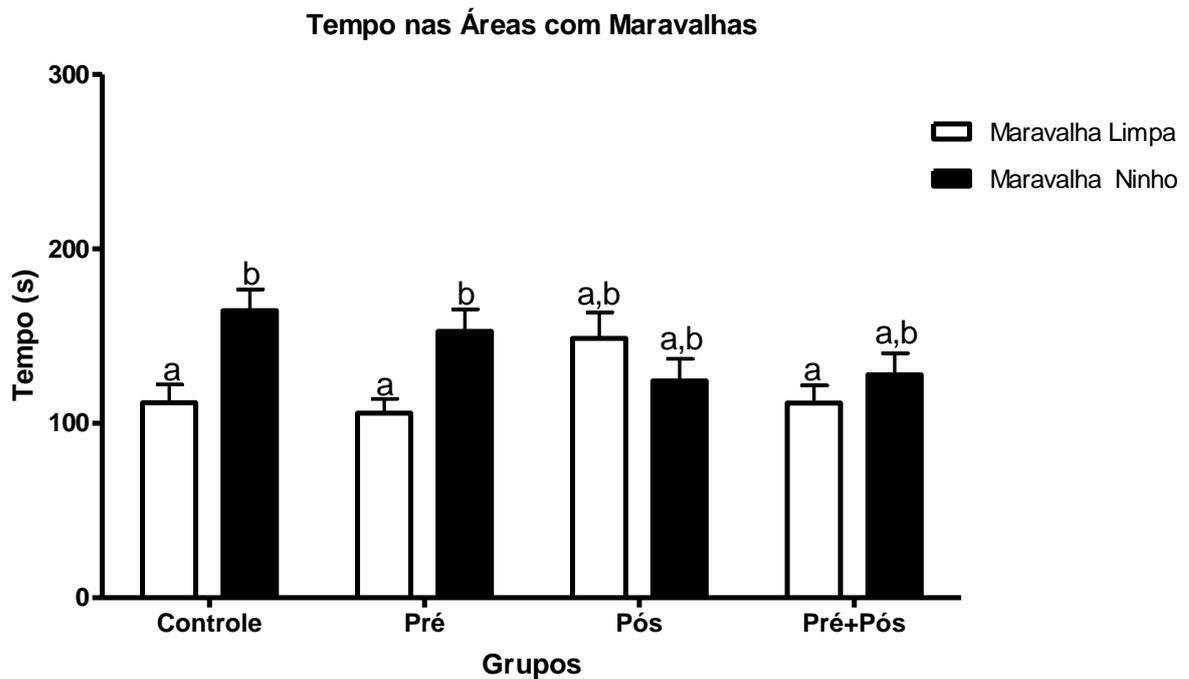
Gráficos 1a - 1d. MÉDIA \pm E.P.M. do tempo nas áreas das maravalhas em filhotes fêmeas em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados utilizando *teste t* sendo considerada uma diferença significativa quando $p < 0,05$. Em cada um dos quatro gráficos (Controle Fêmeas, Pré Fêmeas, Pós Fêmeas e Pré+Pós Fêmeas) colunas cujos valores são estatisticamente diferentes entre si foram representadas por letras diferentes (a,b), enquanto colunas cujos valores não são estatisticamente diferentes entre si foram representados por letras iguais.



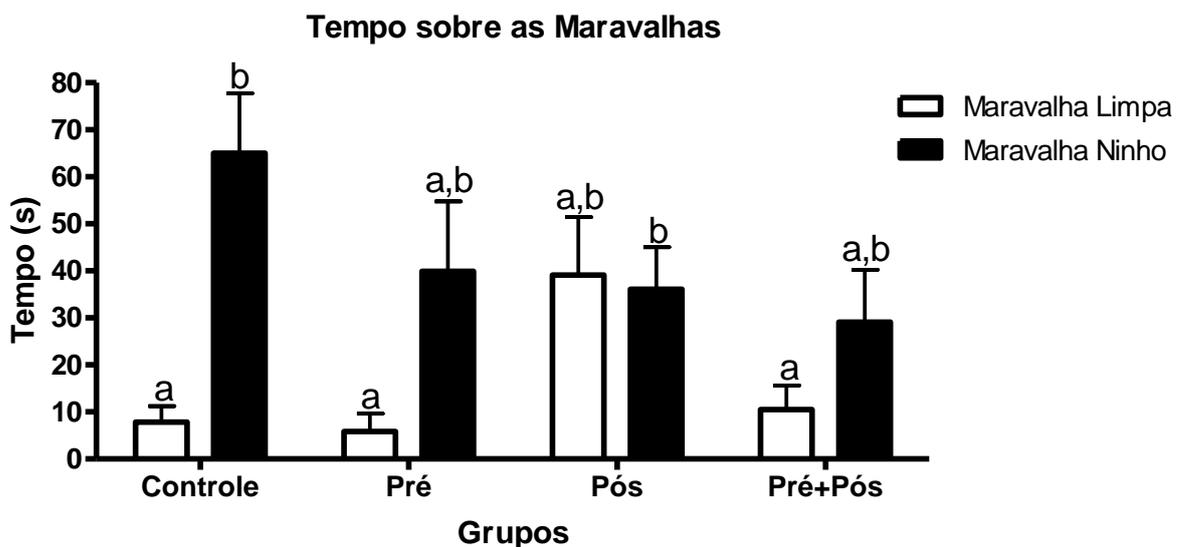
Gráficos 2. MÉDIA ± E.P.M. do tempo total de locomoção em filhotes fêmeas em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via com Newman-Keuls como pós-teste. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram representadas nas colunas através de letras diferentes (a,b) quando $p < 0,05$. Colunas com letras iguais entre si indicam falta de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).



Gráficos 3. MÉDIA ± E.P.M. da frequência de chegada nas áreas contendo maravalhas (limpa ou do ninho) em filhotes fêmeas em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (interação entre grupos e maravalhas) com Newman-Keuls como pós-teste. Comparou-se a frequência de chegada nas maravalhas dentro de cada grupo e entre os grupos, de modo que diferenças estatisticamente significativas na frequência de chegada nas maravalhas limpa e do ninho em cada grupo e/ou entre os grupos foram representadas nas colunas através de letras diferentes (a, b) quando $p < 0,05$. Colunas com letras iguais entre si indicam falta de diferença estatisticamente significativa na frequência de chegada nas maravalhas dentro e/ou entre os grupos ($p \geq 0,05$).



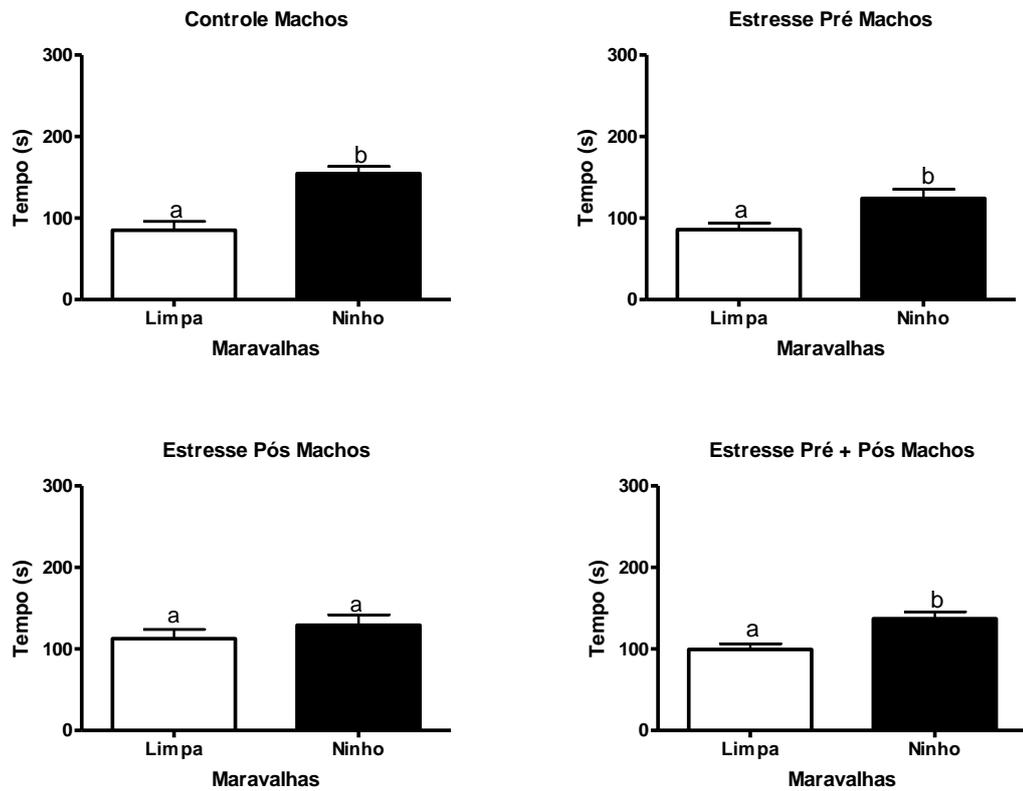
Gráficos 4. MÉDIA \pm E.P.M. do tempo em que os filhotes fêmeas ficaram em cada uma das duas áreas (área contendo maravalha limpa e área contendo maravalha do ninho) em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (interação entre grupos e maravalhas) com Newman-Keuls como pós-teste. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram representadas nas colunas através de letras diferentes (a, b) quando $p < 0,05$. Colunas com letras iguais entre si indicam falta de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).



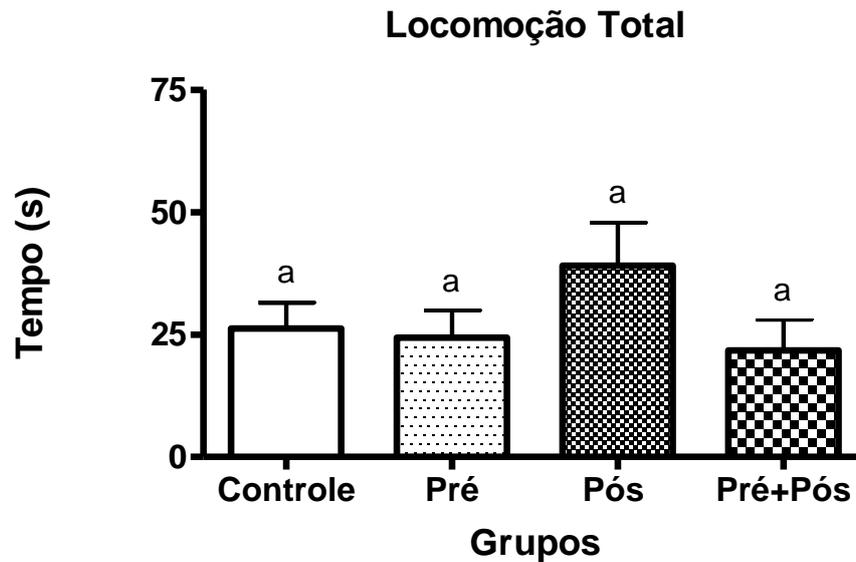
Gráficos 5. MÉDIA \pm E.P.M. do tempo sobre as maravalhas (limpa e do ninho) em filhotes fêmeas em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados com Kruskal-Wallis (interação entre grupos e maravalhas) com teste de Dunn como pós-teste. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram representadas nas colunas através de letras diferentes (a, b) quando $p < 0,05$. Colunas com letras iguais entre si indicam falta de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).

4.1.2 Machos

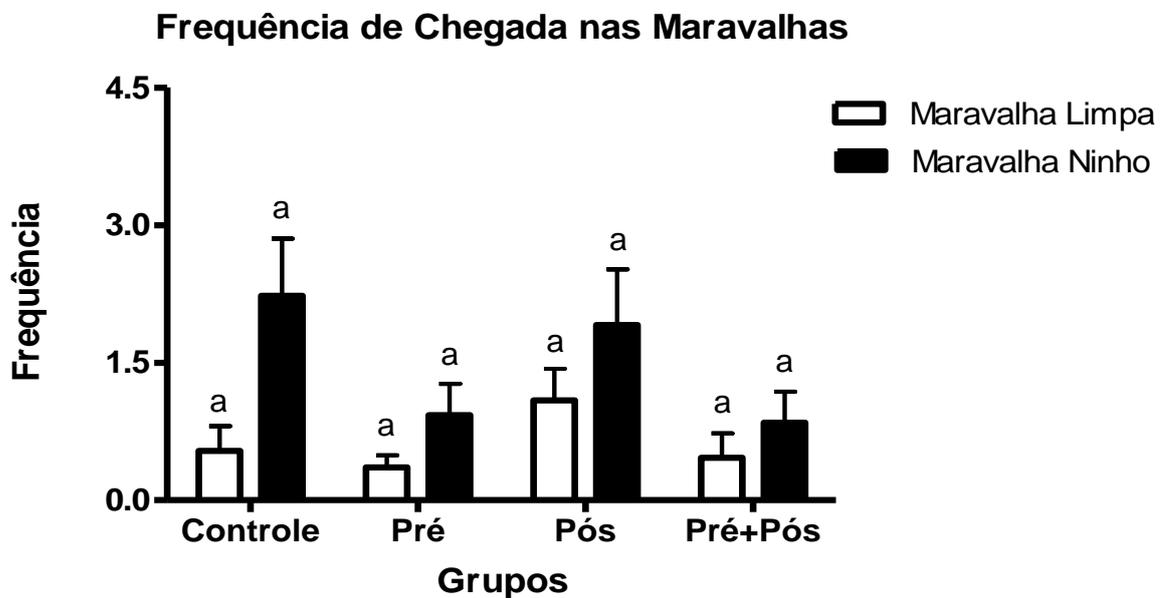
Preferência entre as Maravalhas nos Diferentes Grupos



Gráficos 6a - d. MÉDIA \pm E.P.M do tempo nas áreas das maravalhas em filhotes machos em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados utilizando *teste t* sendo considerada uma diferença significativa quando $p < 0,05$. Em cada gráfico colunas cujos valores são estatisticamente diferentes entre si foram representadas por letras diferentes (a,b), enquanto colunas cujos valores não são estatisticamente diferentes entre si foram representados por letras iguais.

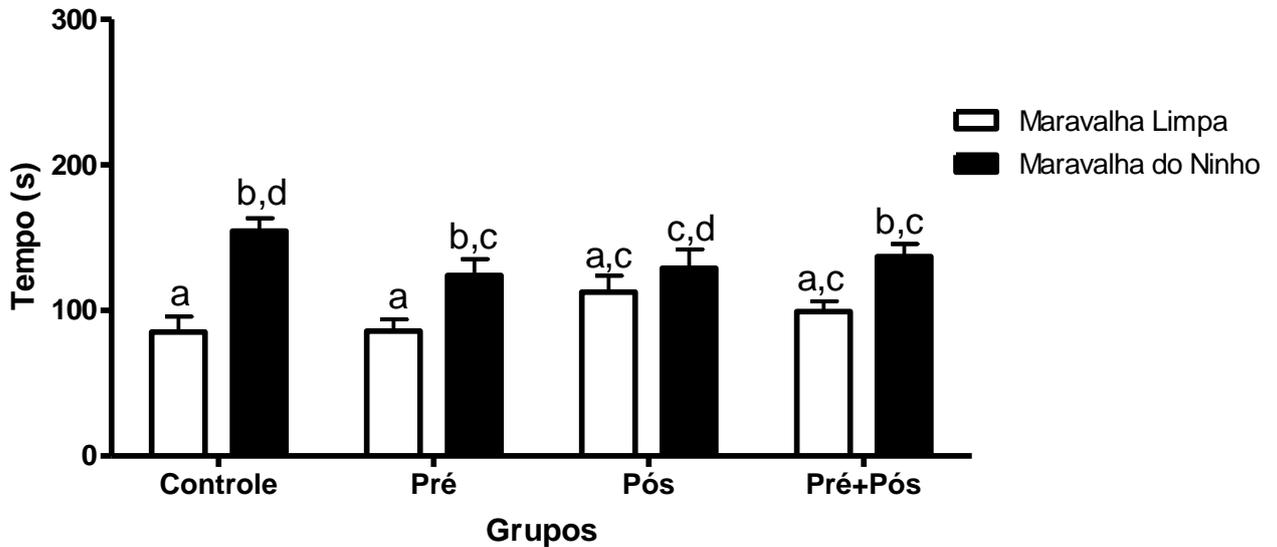


Gráficos 7. MÉDIA \pm E.P.M. do tempo total de locomoção em filhotes machos em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via, sendo considerada uma diferença estatisticamente significativa apenas quando $p < 0,05$. As letras iguais em cima das colunas representam a falta de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$) na Locomoção Total.



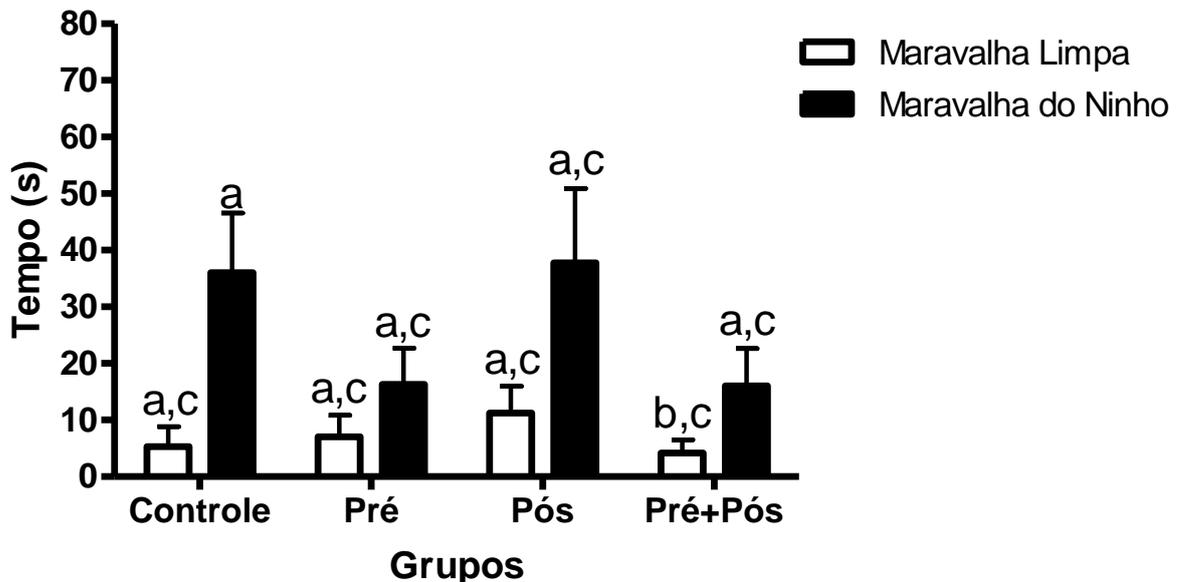
Gráficos 8. MÉDIA \pm E.P.M. da frequência de chegada nas áreas contendo maravalhas (limpa ou do ninho) em filhotes machos em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados com Kruskal-Wallis (interação entre grupos e maravalhas), sendo considerada uma diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. As letras iguais em cima das colunas representam a falta de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$) na Frequência de Chegada nas Maravalhas.

Tempo nas Áreas com Maravalhas



Gráficos 9. MÉDIA \pm E.P.M. do tempo em que os filhotes machos ficaram em cada uma das duas áreas (área contendo maravalha limpa e área contendo maravalha do ninho) em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias (interação entre grupos e maravalhas) com Newman-Keuls como pós-teste. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram representadas nas colunas através de letras diferentes (a, b, c, d) quando $p < 0,05$. Colunas com letras iguais entre si indicam falta de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).

Tempo sobre as Maravalhas



Gráficos 10. MÉDIA \pm E.P.M. do tempo sobre as maravalhas (limpa e do ninho) em filhotes machos em DPN 9 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados com Kruskal-Wallis (interação entre grupos e maravalhas) com teste de Dunn como pós-teste. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram representadas nas colunas através de letras diferentes (a, b, c) quando $p < 0,05$. Colunas com letras iguais entre si indicam falta de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).

4.2 Experimento II

Concentração de hormônios relacionados com as respostas ao estresse dosados por Radioimunoensaio (RIA).

Para todos os dados obtidos através da técnica de RIA o número de animais por grupo (n) foi:

Grupo Controle Fêmeas: 15;	Grupo Controle Machos: 16;
Grupo Estresse Pré Fêmeas: 16;	Grupo Estresse Pré Machos: 16;
Grupo Estresse Pós Fêmeas: 17;	Grupo Estresse Pós Machos: 14;
Grupo Estresse Pré+Pós Fêmeas: 18.	Grupo Estresse Pré+Pós Machos: 19.

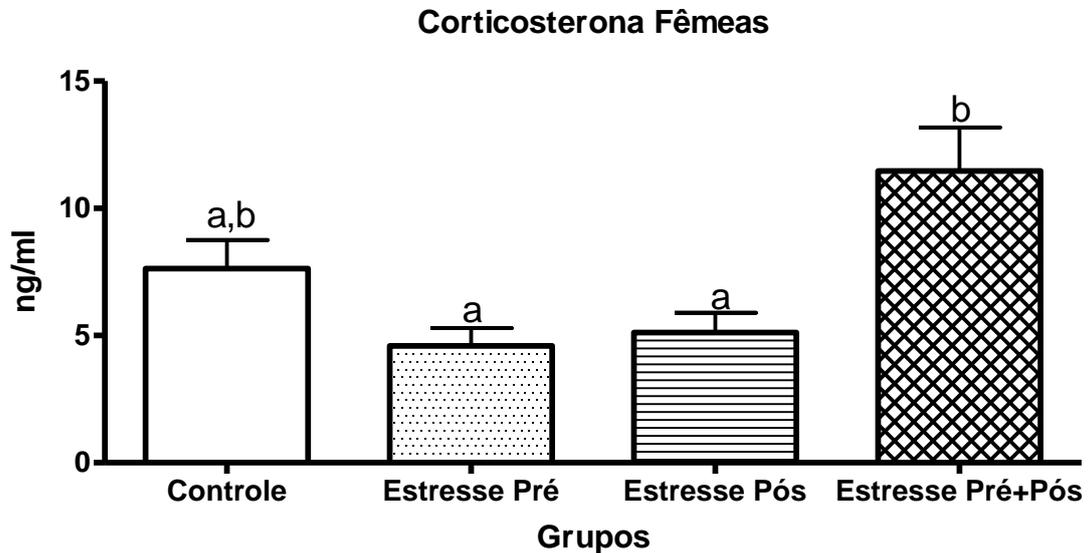
Os gráficos estão expressos em médias \pm erros médios padrões (E.P.M.).

Os resultados desse experimento demonstram que o estresse perinatal aqui empregado teve efeitos diferentes sobre a concentração plasmática de corticosterona e prolactina de fêmeas e machos de um dia de vida (DPN 1).

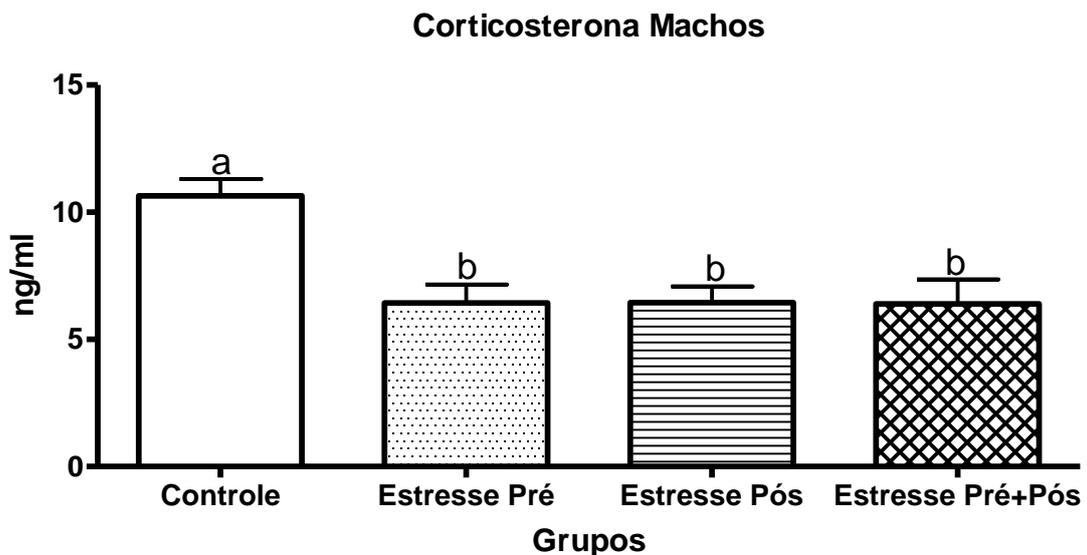
No caso da corticosterona os estresses combinados (grupo *Estresse Pré+Pós*) em fêmeas levaram a uma tendência de aumento em relação ao grupo *Controle* (Gráfico 11) enquanto que nos machos ocorreu uma diminuição desse mesmo hormônio em todos os grupos submetidos ao estresse quando comparados ao grupo *Controle* (Gráfico 12).

Já em relação à prolactina foi observado efeito do estresse perinatal apenas nas fêmeas (Gráfico 13) enquanto que nos machos todos os grupos tiveram resultados semelhantes (Gráfico 14). Nas fêmeas a prolactina seguiu o mesmo padrão da corticosterona, ou seja, o estresse combinado levou a uma tendência de aumento em relação ao grupo *Controle*.

4.2.1 Corticosterona

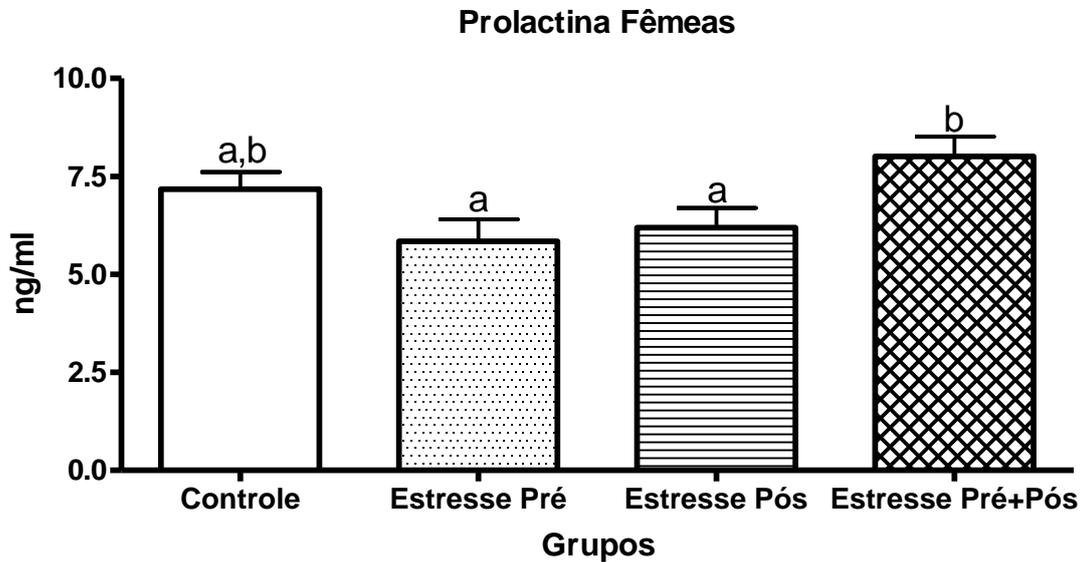


Gráficos 11. MÉDIA \pm E.P.M. da concentração plasmática de corticosterona em filhotes fêmeas em DPN 1 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados com Kruskal-Wallis com teste de Dunn como pós-teste. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram representadas nas colunas através de letras diferentes (a, b) quando $p < 0,05$. Colunas com letras iguais entre si indicam falta de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).

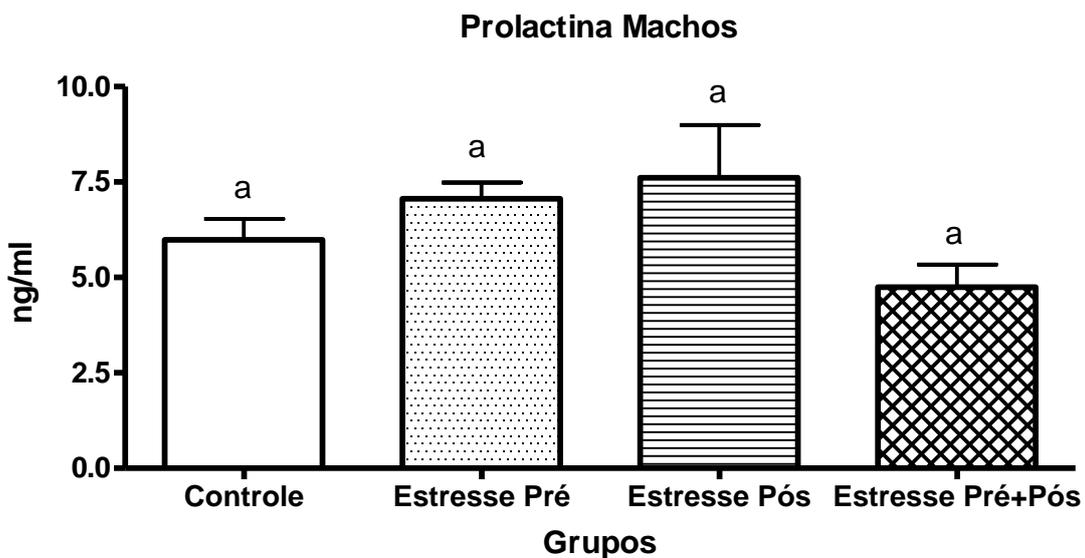


Gráficos 12. MÉDIA \pm E.P.M. da concentração plasmática de corticosterona em filhotes machos em DPN 1 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados com ANOVA de uma via com Newman-Keuls como pós-teste. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram representadas nas colunas através de letras diferentes (a, b) quando $p < 0,05$. Colunas com letras iguais entre si indicam falta de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).

4.2.2 Prolactina



Gráficos 13. MÉDIA \pm E.P.M. da concentração plasmática de prolactina em filhotes fêmeas em DPN 1 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados com ANOVA de uma via com Newman-Keuls como pós-teste. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram representadas nas colunas através de letras diferentes (a, b) quando $p < 0,05$. Colunas com letras iguais entre si indicam falta de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).



Gráficos 14. MÉDIA \pm E.P.M. da concentração plasmática de prolactina em filhotes machos em DPN 1 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados com Kruskal-Wallis. As letras iguais em cima das colunas representam a falta de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$) na concentração de prolactina dos filhotes machos.

4.3 Experimento III

Concentração de ocitocina líquórica dosada por Elisa (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

Para todos os dados obtidos através da técnica de Elisa o número de animais por grupo (n) foi:

Grupo Controle Fêmeas: 8;

Grupo Controle Machos: 7;

Grupo Estresse Pré Fêmeas: 6;

Grupo Estresse Pré Machos: 7;

Grupo Estresse Pós Fêmeas: 8;

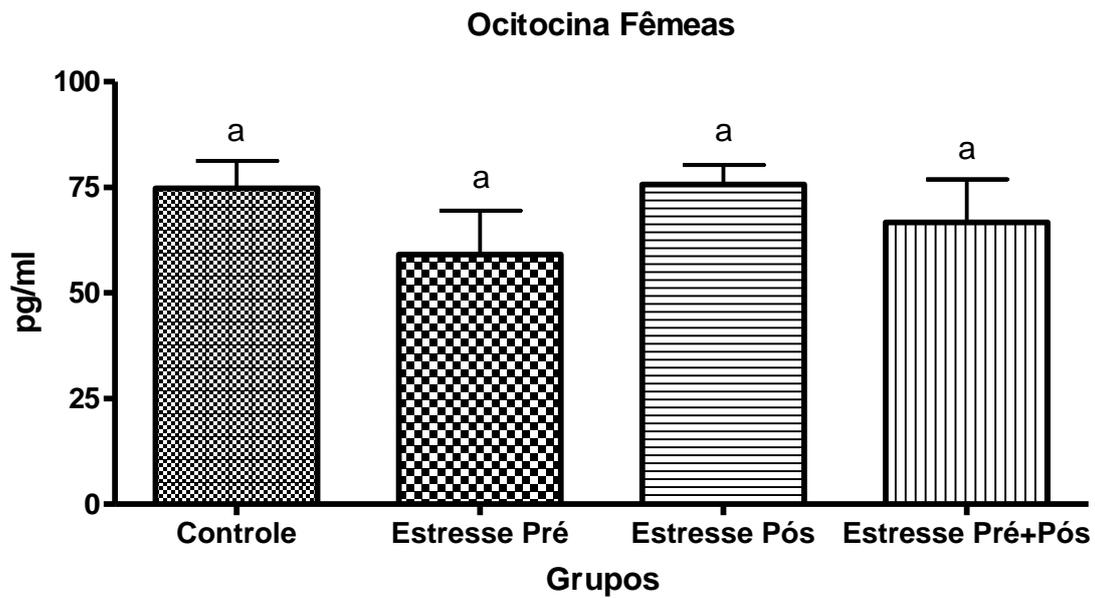
Grupo Estresse Pós Machos: 9;

Grupo Estresse Pré+Pós Fêmeas: 7.

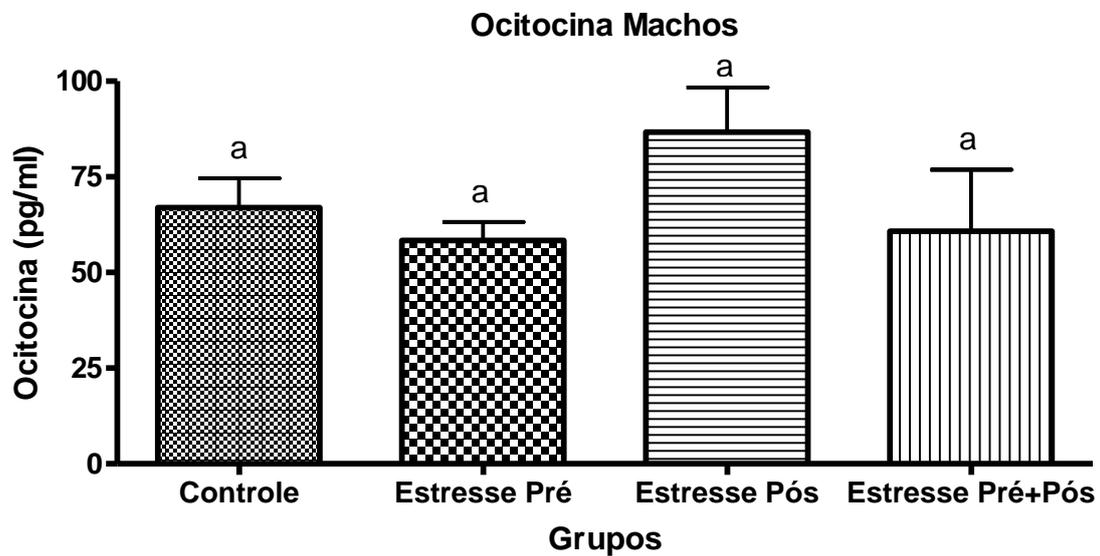
Grupo Estresse Pré+Pós Machos: 6.

Os gráficos estão expressos em médias \pm erros médios padrões (E.P.M.).

Os resultados desse experimento demonstram que o estresse perinatal aqui empregado não teve efeito sobre a concentração de ocitocina central de fêmeas (Gráfico 15) e machos (Gráfico 16) de ratos de um dia de vida (DPN 1).



Gráficos 15. MÉDIA \pm E.P.M. da concentração líquórica (central) de ocitocina em filhotes fêmeas em DPN 1 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados com ANOVA de uma via. As letras iguais em cima das colunas representam a falta de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$) na concentração de ocitocina dos filhotes fêmeas.



Gráficos 16. MÉDIA \pm E.P.M. da concentração líquórica (central) de ocitocina em filhotes machos em DPN 1 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados com ANOVA de uma via. As letras iguais em cima das colunas representam a falta de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$) na concentração de ocitocina dos filhotes machos.

4.4 Número de Filhotes Vivos por Ninhada

Tabela do número de filhotes vivos em DPN 1 em cada uma das ninhadas usadas para as coletas de sangue e líquido.

Ninhadas Controle	N° de Filhotes		Ninhadas Estresse Pré	N° de Filhotes		Ninhadas Estresse Pós	N° de Filhotes		Ninhadas Estresse Pré+Pós	N° de Filhotes	
	Fêmeas	Machos		Fêmeas	Machos		Fêmeas	Machos		Fêmeas	Machos
1	1	3	1	4	2	1	3	4	1	5	3
2	5	5	2	4	7	2	2	0	2	6	4
3	4	6	3	5	3	3	6	3	3	8	3
4	4	4	4	8	3	4	5	5	4	4	3
5	4	4	5	6	5	5	6	5	5	6	3
6	6	2	6	5	4	6	6	1	6	3	4
7	5	4	7	7	5	7	4	3	7	4	1
8	4	1	8	5	2	8	7	5	8	2	6
9	4	3	9	5	4	9	2	5	9	5	3
10	5	3	10	5	3	10	3	4	10	4	6
11	6	2	11	3	8	11	7	7	11	6	6
12	4	5	12	7	6	12	3	1	12	5	6
13	4	5	13	4	4	13	6	5	13	4	3
14	2	4	14	5	5	14	4	4	14	3	6
15	5	6	15	5	7	15	8	3	15	4	5
16	8	4	16	4	6	16	5	6	16	6	1
17	2	4	17	6	6	17	3	4	17	4	7
18	5	2	18	4	4	18	5	5	18	4	5
19	7	5	19	3	4	19	1	2	19	4	6
20	6	4	20	4	5	20	6	4	20	3	6
21	7	2	21	6	3	21	8	5	21	1	1
22	5	4	22	4	6	22	8	5	22	6	6
23	8	4	23	5	7	23	3	6	23	6	4
24	7	5	24	5	6	24	2	4	24	8	4
25	5	2	25	6	8	25	1	9	25	3	5
			26	4	6	26	6	2	26	5	8
			27	2	5	27	1	8	27	5	5
			28	9	3	28	1	2	28	3	3
						29	4	5			
						30	6	6			
						31	4	6			
						32	6	6			
						33	5	4			
MÉDIA	4,92	3,72	MÉDIA	5	4,89	MÉDIA	4,45	4,36	MÉDIA	4,54	4,39

Tabela 1. Número de filhotes (fêmeas e machos) nascidos vivos em cada grupo amostral em ambos os sexos. Os dados foram analisados com ANOVA de uma via, não sendo observada diferença significativa entre os grupos, considerou-se uma diferença significativa quando $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Os filhotes dos quatro grupos experimentais desse trabalho (*Controle*, *Estresse Pré*, *Estresse Pós* e *Estresse Pré+Pós*) diferem unicamente no que se refere à exposição ao estresse perinatal: enquanto os animais do grupo *Controle* não foram expostos a nenhum protocolo de estresse os animais dos demais grupos foram expostos a um protocolo de estresse (grupo *Estresse Pré* e grupo *Estresse Pós*) ou à combinação de dois tipos de estresse (grupo *Estresse Pré+Pós*). Esses dois tipos de estresse perinatal foram bem distintos tanto quanto ao período de aplicação quanto ao tempo de duração do estresse. Enquanto o estresse pré-natal foi utilizado durante todo o último terço da gestação (última semana gestacional) o estresse pós-natal foi aplicado de forma aguda no primeiro dia após o parto (DPN 1). Assim, o que avaliamos nos filhotes do grupo *Estresse Pré* é resultado da exposição materna prolongada ao estresse gestacional, ou seja, é o efeito indireto do estresse gestacional prolongado e contínuo sobre os filhotes, é a mãe que está mediando as consequências do estresse nesses filhotes. Já no grupo *Estresse Pós* a ninhada inteira (mãe e filhotes) foi exposta agudamente ao estresse, o que avaliamos nesses filhotes é tanto reflexo do estresse agudo a que a mãe é submetida (efeito indireto sobre os filhotes) como reflexos diretos da exposição aguda dos filhotes ao estressor. Finalmente, no grupo *Estresse Pré+Pós* observamos as consequências da junção dos dois estressores, um prolongado e indireto e outro agudo direto e indireto, em filhotes de ratos.

Procurar por possíveis alterações comportamentais em filhotes muito jovens de ratos é uma tarefa um tanto limitada, por isso nesse estudo aliou-se um teste comportamental com outros parâmetros que pudessem refletir alterações advindas do estresse perinatal sobre esses filhotes. Assim, junto com o Teste de Preferência Olfatória foram realizadas dosagens de hormônios que normalmente se alteram com eventos estressores, desse modo, as dosagens de corticosterona e prolactina plasmática pretendiam avaliar possíveis alterações que pudessem estar ocorrendo nos níveis desses hormônios em filhotes cujas mães foram expostas ao estresse

perinatal. Outro parâmetro testado foi o nível central de ocitocina, pois este está fortemente relacionado ao apego entre mãe-filhote. Com isso, tentamos avaliar como eventos estressores poderiam influir nas respostas de filhotes ao estresse e na criação de vínculo entre mãe-filhote.

A relação entre o indivíduo e seu ambiente de desenvolvimento tem sido frequentemente relacionada como uma correlação linear, sendo que uma boa experiência levaria a adaptações funcionais e más condições levariam a resultados negativos ou patologias futuras. Essa visão considera o organismo como sendo uma entidade passiva influenciada pelas mudanças ambientais. Uma visão mais compreensiva vê isso como uma capacidade altamente adaptativa de plasticidade fenotípica, sendo que as informações que chegam ao filhote nesse ambiente precoce são mediadas pela relação do filhote com sua mãe que “informaria” a ele as características de seu ambiente futuro (Hipótese da Mediação Maternal) (MACRÍ *et al.*, 2011). Assim, o comportamento maternal desempenha importante papel sobre o desenvolvimento adequado dos filhotes. Estudos mostram que a mãe regula diversos processos fisiológicos dos filhotes, tais como frequência cardíaca, ciclo sono/vigília e produção de hormônio de crescimento (LEVINE, 2001). Alterações no comportamento maternal estão relacionadas a diversas consequências sobre os filhotes de mamíferos. Desse modo, os resultados apresentados nessa dissertação são ao menos em parte reflexos da alteração no padrão do comportamento materno.

O comportamento materno das ninhadas desse estudo foi analisado entre o segundo e o oitavo dia pós-parto e verificou-se flutuações pontuais nos comportamentos ao longo desses dias embora a média semanal tenha permanecido inalterada entre os quatro grupos experimentais (FERREIRA, 2010). Essas alterações ao longo dos dias no padrão do comportamento maternal afeta a estabilidade desse comportamento, estabilidade essa que parece ser fundamental para uma eficaz relação mãe-filhote e conseqüentemente para um desenvolvimento adequado dos filhotes. Os resultados que encontramos nos filhotes podem ser

ao menos em parte reflexos dessa instabilidade. Como não medimos o comportamento no primeiro dia pós-parto não podemos ter certeza se os filhotes usados para as dosagens de corticosterona, prolactina e ocitocina também foram expostos a alterações no comportamento maternal, no entanto, como as flutuações ocorreram de modo disperso ao longo de oito dias é possível que o comportamento materno já estivesse alterado no 1º dia pós-natal. Já os filhotes submetidos ao Teste de Preferência Olfatória no nono dia pós-parto vieram das mesmas ninhadas usadas para a observação do comportamento maternal estando, portanto, expostos às alterações maternas aqui citadas.

5.1 Estresse Pré-Natal

Esperávamos que a redução do substrato para a construção do ninho fosse um grande gerador de estresse para as ratas prenhas, no entanto, isso não se evidenciou, uma vez que poucos dos parâmetros testados foram alterados no grupo de animais que foram submetidos a apenas esse estresse (grupo *Estresse Pré*). Um bom parâmetro para se avaliar a eficácia do estresse gestacional é o número de filhotes nascidos vivos em cada ninhada, espera-se uma redução no número de nascidos vivos em gestações sob estresse. Controlamos o número de filhotes nascidos vivos em nossas ninhadas e não observamos diferença nesse número entre os quatro grupos. Sendo assim, nosso protocolo de estresse por restrição de maravalha gestacional não foi capaz de provocar uma redução no número de filhotes vivos por ninhada (Tabela 1), o que pode estar refletindo uma ineficácia do nosso modelo em gerar estresse gestacional.

O aparente pequeno efeito da restrição de maravalha talvez possa ser explicado por uma observação simples: na verdade não ocorreu uma grande redução de substrato para a construção do ninho, pois embora tenhamos diminuído em muito a quantidade de maravalha colocada nas caixas residências (20 g ao invés das aproximadas 120 g habituais) a rata dispunha de outro substrato para a construção do ninho: a lâmina de papel filtro colocado sob a maravalha. A

princípio a função desse papel seria simplesmente absorver a urina dos animais, no entanto, ele foi utilizado para a construção do ninho. Assim que as ratas prenhas dos grupos *Estresse Pré* e *Estresse Pré+Pós* eram individualizadas em caixas com restrição de maravalha elas prontamente começavam a rasgar o papel filtro até que toda a lâmina fosse transformada em migalhas de papel que misturadas à maravalha eram usadas na construção do ninho.

Outro fator que pode ter influenciado em nosso modelo de estresse pré-natal é que as ratas além de conseguirem obter um ninho aparentemente razoável passavam um longo período nesse processo de rasgar a lâmina de papel filtro para poder construir o ninho. Essa motivação em ter que buscar e produzir substrato talvez possa ter reduzido o potencial ansiogênico do modelo e assim ter diminuído o potencial estressor dele.

5.2 Estresse Pós-Natal

Espécies que se comportam como presas têm desenvolvido comportamentos específicos para facilitar reconhecimento, prevenção e defesa contra predadores. Tais sistemas comportamentais anti-predadores são fundamentais para a sobrevivência. Em muitos casos a defesa anti-predador envolve detecção e resposta a estímulos químicos específicos produzidos pelo predador. Em espécies macrosmóticas como os ratos a olfação é uma das principais modalidades usadas para detectar predadores (APFELBACH, *et al.*, 2005). Em ratos, há fortes indícios que o odor de gato pode ser processado como um *feromônio-like*, uma vez que a exposição de ratos a quantidades ínfimas de dicas olfativas proveniente de gatos desencadeia respostas inatas, poderosas e estereotipadas além de uma substancial ativação do bulbo olfatório acessório (McGREGOR, *et al.*, 2004). Devido à relevância dessa exposição não é surpreendente que boa parte dos resultados aqui apresentados foram relacionados ao nosso estresse pós-natal.

Boa parte dos estudos que avaliam a influência de gatos sobre ratos foram feitos com cheiro de gato e não com a exposição ao animal em si. Aqui nós expusemos a ninhada à presença física do gato de modo inescapável. Um fato curioso observado durante a aplicação do protocolo de estresse pós-natal é que embora as ratas mães ficassem visivelmente alteradas com a presença do gato o gato em si parecia ficar alheio à presença de sua presa clássica (Fig. 4). No caso da foto trata-se de uma fêmea de aproximadamente três anos e meio, mas outros gatos foram usados e estes também pareceram indiferentes com a presença dos ratos.

Parece que quanto mais jovem o filhote mais vulnerável ele é às adversidades e o 1º dia pós-parto parece desempenhar um papel fundamental para o futuro desenvolvimento dos ratos. No presente estudo não podemos afirmar o quão duradouras são as alterações comportamentais e hormonais observadas, uma vez que os filhotes foram testados apenas em dois momentos: no dia primeiro (DPN 1) no caso das dosagens de corticosterona, prolactina e ocitocina e no dia nove (DPN 9) no teste comportamental, ou seja, após oito dias do último evento estressor o que já demonstra que os efeitos não são temporalmente restritos ao momento do estresse. Há outros trabalhos que apontam para esse mesmo caminho de que as consequências do estresse no 1º dia de vida (DPN 1) são de longo prazo. Filhotes de ratos submetidos ao protocolo de manipulação neonatal (manuseio gentil da ninhada entre as mãos) uma única vez (estresse agudo) no 1º dia pós-parto mostram alterações bioquímicas e comportamentais duradouras (REIS, 2010).

5.3 Teste de Preferência Olfatória

Em filhotes muito jovens a gama de testes comportamentais possíveis de serem realizados é reduzida se comparados com adultos. No *Teste de Preferência Olfatória* aqui realizado utilizamos uma característica presente em filhotes muito jovens: a necessidade de reconhecer e se manter próximos às mães, já que são elas que garantem as condições básicas de sobrevivência desses animais (calor, alimentação e cuidado parental). Em filhotes de nove dias

de vida esse reconhecimento se dá basicamente pelo olfato e o paradigma desse experimento utilizou-se justamente desse sentido. A escolha entre os lados das caixas contento maravalha limpa ou maravalha do ninho representa neste experimento a busca pela mãe guiada pelo odor da maravalha do ninho impregnado de cheiro materno.

Avaliamos tanto o tempo em que os animais ficaram em cada um dos lados das caixas (Tempo nas Áreas com Maravalhas) como o tempo em que esses animais ficar sobre as maravalhas (Tempo sobre as Maravalhas). O primeiro levou em consideração o tempo em que os animais ficaram sobre a área formada pelos pontos A-B-E-F (Fig. 12) quando comparada à área formada pelos pontos B-C-D-E. Já o segundo levou em consideração apenas o tempo em que os animais ficaram diretamente sobre as maravalhas limpa e do ninho representadas no esquema respectivamente pelo retângulo pontilhado e pelo retângulo ondulado.

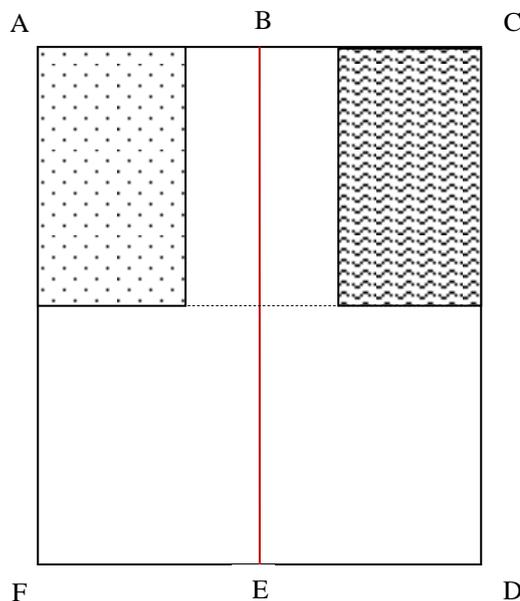


Figura 12. Esquema da caixa onde é feito o Teste de Preferência Olfatória. A linha vermelha representa a linha neutra onde o filhote era colocado no início do teste e os retângulos pontilhados e ondulados representam as maravalhas.

O que vimos nesse experimento foi um claro efeito do estresse perinatal sobre a identificação do odor materno em ambos os gêneros. Tanto fêmeas como machos dos grupos

estressados demonstraram uma redução na preferência pelo odor maternal no nono dia de vida. Em fêmeas a frequência de chegada nas duas maravalhas (retângulos pontilhados e ondulados do esquema) foi igual nos três grupos estressados, enquanto que o grupo controle chegou mais vezes na maravalha do ninho o que parece representar uma maior busca por esta maravalha. Já nos machos não observamos diferença estatisticamente significativa na frequência de chegada nas maravalhas.

Embora em machos a frequência de chegada nas maravalhas tenha sido igual nos diferentes grupos (inclusive no grupo *Controle*), quando avaliamos o tempo em que os animais permaneceram em cada uma das áreas foi observado um efeito do estresse em ambos os sexos. O estresse único no primeiro dia de vida teve um efeito marcante sobre o tempo em que esses animais (fêmeas e machos) ficaram em cada uma das áreas (Gráficos 4 e 9): os animais dos grupos que foram submetidos ao estresse pós-natal (Grupo *Estresse Pós* e Grupo *Estresse Pré+Pós*) permaneceram um tempo semelhante em ambas as áreas, o que demonstra a falta de preferência pelo odor maternal nesses grupos. Já os grupos *Controle* e *Estresse Pré* permaneceram mais tempo sobre as áreas que continham maravalha do ninho, assim, fica claro o efeito do estresse agudo no primeiro dia de vida sobre a preferência olfatória dos filhotes fêmeas e machos no nono dia de vida.

Já quando avaliamos apenas o tempo em que os animais ficaram diretamente sobre as maravalhas (retângulo pontilhado e retângulo ondulado da figura 12) podemos notar tanto o efeito do estresse pós-natal como o efeito do estresse pré-natal (Gráfico 5 e 10). Em fêmeas, o tempo em que os animais permaneceram sobre a maravalha limpa e a maravalha do ninho foi diferente (maior tempo sobre a maravalha do ninho) estatisticamente apenas nos animais do grupo *Controle*. Nos demais grupos não ocorreram diferenças estatisticamente significativas no tempo em que estas fêmeas ficaram entre as duas maravalhas, o que novamente demonstra o

efeito do estresse perinatal sobre a preferência olfatória dos filhotes fêmeas no nono dia de vida (Gráfico 5).

Em machos foi observado um resultado semelhante (Gráfico 10): os três grupos de animais estressados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas no tempo em que ficaram sobre as duas maravalhas (retângulos pontilhados e ondulados da figura 12). No caso dos machos, o grupo *Controle* também permaneceu o mesmo tempo sobre as duas maravalhas, no entanto, é possível que isso tenha ocorrido por um problema na amostra dos animais machos do grupo *Controle*. Observando o gráfico 10 é possível notar uma clara tendência do aumento do tempo gasto sobre a maravalha do ninho no grupo *Controle* que não foi confirmada estatisticamente pelo grande erro padrão da amostra. Esse grande erro foi gerado em grande parte porque um animal do grupo permaneceu parado sobre a linha neutra durante os 300 segundos do teste o que não se repetiu com nenhum outro animal do grupo. Retirando esse animal da amostra teríamos, assim como nas fêmeas, uma preferência em ficar sobre a maravalha do ninho nos machos do Grupo *Controle*.

Além disso, a redução na preferência pelo odor maternal também foi demonstrada quando avaliamos os grupos em separado através do teste *t* (Gráficos 1 *a*, 1 *b*, 1 *c*, 1 *d*) e (Gráficos 6 *a*, 6 *b*, 6 *c*, 6 *d*). Neste teste medimos dentro de cada grupo (*Controle* e Estressados) o tempo em que os animais ficaram em cada um dos lados das caixas. O que observamos nas fêmeas foi que os grupos *Estresse Pós* e *Estresse Pré+Pós* não apresentaram preferência por nenhum dos dois lados da caixa, permanecendo um tempo igual estatisticamente em ambos os lados. Já o grupo *Controle* e o Grupo *Estresse Pré* apresentaram uma preferência pelo lado que contém maravalha do ninho, o que demonstra um claro efeito do estresse agudo no primeiro dia de vida sobre esse parâmetro em fêmeas. Nos machos observamos um resultado semelhante, onde o grupo *Estresse Pós* também permaneceu igualmente entre os dois lados da caixa, no entanto, o grupo *Estresse Pré+Pós* permaneceu

mais tempo no lado que contém maravalha do ninho o que novamente demonstra o efeito do estresse agudo no dia um (DPN 1) sobre a preferência pelo odor maternal.

Poderíamos imaginar que o estresse perinatal pudesse levar a uma diminuição da exploração da área que justificaria a redução na preferência olfatória, no entanto, isto não foi observado já que tanto fêmeas como machos não demonstraram redução na locomoção total durante os testes. O que observamos foi um aumento da locomoção total nas fêmeas do grupo *Estresse Pós* quando comparado aos demais grupos. Nesse grupo de animais a frequência de chegada na maravalha limpa foi maior que a frequência de chegada na maravalha limpa dos demais grupos, sendo igual estatisticamente à frequência de chegada na maravalha do ninho do grupo controle, isso demonstra uma maior indefinição na escolha entre os lados e se reflete nesse aumento da locomoção total dessas fêmeas, já que elas chegam e saem mais vezes das maravalhas. Esse aumento na chegada à maravalha limpa reflete um aumento na escolha pelo lado limpo estatisticamente significativo quando comparado à frequência de chegada dos outros grupos na mesma maravalha o que demonstra um forte efeito do estresse agudo realizado no primeiro dia de vida sobre a preferência pelo odor maternal nas filhotes fêmeas. Nos filhotes machos não observamos esse aumento na locomoção total e nem diferenças significativas entre os grupos na frequência de chegada nas maravalhas.

Cabe ressaltar que o teste de Preferência Olfatória avaliou os animais expostos ao estresse perinatal no nono dia de vida (DPN 9). Entre o fim dos protocolos de estresse (DPN 1) e a realização do teste transcorreram oito dias, durante os quais esses animais estavam expostos a outra variante que muito provavelmente tenha influenciado nos resultados. Essa variante foi o comportamento maternal desempenhado pelas ratas mães desses filhotes. Embora a avaliação do comportamento maternal não fosse um dos objetivos dessa dissertação ela foi realizada e faz parte dos resultados de outra dissertação (FERREIRA, 2010).

O comportamento maternal foi observado entre o segundo e o oitavo dia pós-parto através de quatro seções diárias de 72 minutos, conforme a tabela do Anexo 01. Os resultados obtidos demonstram que o estresse perinatal não alterou as médias semanais dos comportamentos maternos avaliados, no entanto, ocorreu uma clara modificação no padrão do comportamento maternal ao longo dos dias de observação. Essa modificação se reflete numa flutuação diária para cima e/ou para baixo dos comportamentos dos grupos estressados quando comparados ao grupo *Controle*, flutuação essa que acaba sendo diluída na média semanal. Essa irregularidade do padrão do comportamento maternal está sendo relacionada com alterações comportamentais e neuroendócrinas nos filhotes submetidos a elas, no caso de nosso experimento não podemos negligenciar esse fator em nossos resultados, já que os filhotes necessitam de uma mãe estável em seus comportamentos para seu desenvolvimento adequado.

5.4 Concentração de Corticosterona

Em nossos animais os protocolos de estresse perinatal foram capazes de provocar alterações na concentração de corticosterona dos filhotes machos de um dia de vida contrárias ao que esperávamos a princípio. Nesses animais ocorreu uma diminuição da corticosterona nos três grupos de animais sujeitos ao estresse perinatal (grupos *Estresse Pré*, *Estresse Pós* e *Estresse Pré+Pós*) quando comparados ao grupo *Controle*. Em fêmeas não observamos diferença significativa nesses níveis entre nenhum dos três grupos estressados quando comparados ao grupo *Controle*, embora tenha ocorrido uma tendência de diminuição desses níveis no grupo *Estresse Pré* e no grupo *Estresse Pós* quando comparados ao grupo *Controle* e uma clara tendência de aumento no grupo *Estresse Pré+Pós* quando novamente comparados ao grupo *Controle*. No entanto, ocorreu um aumento estatisticamente significativo entre as fêmeas do grupo *Estresse Pré+Pós* quando comparadas às fêmeas dos grupos *Estresse Pré* e *Estresse Pós*.

Durante o desenvolvimento precoce a hiporresponsividade do eixo HPA (refletida por baixos níveis de corticosterona) é crítico para permitir o manejo de estresses agudos bem como para permitir o crescimento e maturação de processos que são prejudicados por aumento dos glicocorticóides. Nesses filhotes a regulação e a resposta do eixo HPA é mediado principalmente por eventos envolvidos com cuidado maternal. Levando em consideração que os animais aqui testados estão dentro do período hiporresponsivo ao estresse esperaríamos com nossos modelos de estresse um aumento da corticosterona, já que os modelos usados estão relacionados à mãe e eventos estressores que alteram a relação entre mãe e filhotes já foram descritos como um dos poucos capazes de provocar mudanças nos níveis desses hormônios mesmo no período hiporresponsivo (BRUNSON *et al.*, 2001), ou seja, esperávamos que nosso modelo de estresse fosse capaz de gerar aumento de corticosterona em filhotes de ratos durante o período hiporresponsivo ao estresse. No entanto, não vimos esse aumento nos nossos animais, mas vale lembrar que normalmente esses estudos de resposta ao estresse são feitos com filhotes mais velhos do que os que foram testados aqui.

Levando em consideração os resultados aqui apresentados poderíamos cogitar que os sistemas de resposta ao estresse estejam ainda mais inibidos no primeiro dia de vida do que nos dias seguintes e isso poderia ser justificado pelos danos potencialmente maiores ocasionados pela exposição aos glicocorticóides em filhotes mais jovens, já que a administração de corticosterona durante o desenvolvimento tem mostrado efeitos permanentes no crescimento e na diferenciação de diversos sistemas incluindo o sistema nervoso central (SNC) (LEVINE, 2001). A ação da corticosterona sobre os neurônios pode ser de inibição da utilização da glicose, que é uma característica da ação periférica dos glicocorticóides (SAPOLSKY *et al.*, 1988).

Embora os níveis de corticosterona sejam normalmente pequenos no período hiporresponsivo ao estresse, em ratos e muitas outras espécies a maturação final dos pulmões está relacionado a um aumento fisiológico nas concentrações de glicocorticóides durante a fase

final de gestação e nas primeiras horas de vida (HOLT & OLIVER, 1968; DI MARCO *et al.*, 1978) que pode estar influenciando em nossos resultados uma vez que não mensuramos se o estresse pré-natal está ou não influenciando nesse pico. Supondo que o estresse pré-natal possa diminuir a magnitude desse aumento, a subsequente queda na concentração de corticosterona que normalmente ocorre levaria a níveis mais baixos mais rapidamente. No entanto, como essa redução da corticosterona em DPN 1 (dia pós-natal 1) também ocorreu nos machos do grupo *Estresse Pós* (onde não se pode justificar tal diminuição como sendo reflexo do estresse sobre esse aumento gestacional) parece razoável cogitar que mesmo nos grupos submetidos ao estresse pré-natal a diminuição da corticosterona não se deve à redução nesse pico gestacional tardio.

É bem difundida a idéia de que altos níveis de corticosterona causam danos ao SNC, no entanto, a diminuição da corticosterona observada nos machos dos grupos estressados não é necessariamente um indício de proteção, uma vez que a ausência de glicocorticóides também afeta o desenvolvimento do SNC, são os níveis baixos e relativamente constantes que garantem a maturação normal dos filhotes (LEVINE, 2001).

Já nas fêmeas, os resultados de corticosterona apresentaram um padrão diferente ao dos machos, já que a associação do estresse pré-natal com o pós-natal levou a um aumento desse hormônio. Esse aumento da corticosterona apresentada pelas fêmeas do grupo *Estresse Pré+Pós* em relação aos grupos *Estresse Pré* e *Estresse Pós* é um resultado curioso que parece resultar de uma sensibilização gerada pelo estresse gestacional capaz de deflagrar um aumento na corticosterona quando esses mesmos animais são submetidos ao estresse em DPN 1. Essa sensibilização não é algo tão surpreendente quando levamos em consideração o fato do estresse pré-natal ser capaz de gerar alterações no intercâmbio entre mãe-filhotes dos hormônios gonadais e adrenais levando a alterações nas concentrações desses hormônios em um período crítico para a diferenciação hipotalâmica que por sua vez pode levar a disfunções ao longo da

vida (HERRENKOHL, 1979) e que em nosso caso pode estar relacionada à sensibilização gerada pelo estresse gestacional.

Em relação aos grupos *Estresse Pré* e *Estresse Pós* as fêmeas, ao contrário dos machos, não tiveram uma redução estatisticamente significativa da corticosterona em relação ao grupo *Controle*, embora tenha ocorrido uma tendência para essa diminuição.

As diferenças entre os resultados de machos e fêmeas demonstram que mesmo muito precocemente fêmeas e machos respondem de modo diferente aos eventos estressores. O próprio cuidado maternal dispensado pelas mães aos filhotes fêmeas e machos é naturalmente diferente, já que as mães permanecem mais tempo cuidando dos filhotes machos do que das fêmeas (OOMEN *et al.*, 2009) o que pode tornar os machos normalmente mais vulneráveis a alterações no comportamento maternal. Essa disparidade no cuidado maternal que os diferentes gêneros recebem é causada por uma outra diferença hormonal que precocemente os filhotes já apresentam: os filhotes machos apresentam um pico de testosterona no dia do parto (WARD *et al.* 2002). E essa maior concentração de testosterona plasmática apresentada pelos filhotes machos acaba gerando essa diferença no cuidado maternal, pois as mães passam mais tempo cuidando dos animais com maior concentração de testosterona (MOORE, 1982). Assim, mesmo no primeiro dia pós-parto já é possível observamos diferenças de gênero nesses animais.

5.5 Concentração de Prolactina

Embora a regulação da secreção de prolactina não seja completamente conhecida o estresse é um dos mais importantes estímulos fisiológicos para sua secreção, de modo que a prolactina integra os sistemas relacionados com as respostas ao estresse. O peptídeo liberador de prolactina (PrRP) recentemente isolado do hipotálamo é atualmente o principal candidato para ser o fator liberador de prolactina. Ele liga-se a um receptor órfão associado à proteína G

que é expresso em certas áreas encefálicas e na hipófise anterior estimulando a secreção de prolactina e antagonizando o efeito tônico inibitório da dopamina que por sua vez é o mais importante inibidor da secreção da prolactina. (YAMADA *et al.*, 2009).

Além dos efeitos sobre a prolactina o PrRP também estimula o eixo HPA via aumento de CRH (hormônio liberador da corticotrofina) (YAMADA *et al.*, 2009). No entanto, a imunoneutralização do PrRP parece não afetar o lançamento da prolactina induzida pelo estresse o que demonstra que sob diferentes condições diferentes sinalizadores podem ser recrutados para a secreção de prolactina (SWINNEN *et al.*, 2005). A ligação do PrRP com o eixo HPA não ocorre apenas em roedores, em ovelhas a injeção intracerebroventricular de PrRP além de levar a um aumento na prolactina também ativa o eixo HPA evocando uma resposta dose dependente de cortisol, sugerindo que também nessa espécie oPrRP está envolvido tanto na secreção de prolactina como no controle do eixo HPA (KITAGAWA *et al.*, 2011). O que é evidente é que, de uma forma ou outra, o estresse está interconectado nessas rotas, seja pela ativação do eixo HPA pelo mesmo peptídeo que também causa o aumento da prolactina, seja por outras formas ainda não bem compreendidas em que o estresse leve ao aumento da prolactina por outras vias não associadas ao PrRP.

Em nossos experimentos avaliamos o efeito do estresse pré-natal e do estresse pós-natal agudo sobre os níveis de prolactina, uma vez que o estresse é um dos principais fatores de aumento da prolactina. No entanto, nosso modelo de estresse não foi capaz de levar a grandes alterações nesse hormônio. Em fêmeas é possível que tenha ocorrido uma sensibilização gerada pelo estresse pré-natal nos animais do grupo *Estresse Pré+Pós*, pois observamos um aumento no nível de prolactina plasmática dessas fêmeas quando comparadas às fêmeas dos outros dois grupos estressados (grupo *Estresse Pré* e grupo *Estresse Pós*). No entanto, nenhum dos três grupos de fêmeas sujeitas ao estresse perinatal tiveram concentrações de prolactina em DPN 1 diferentes da concentração de prolactina do grupo *Controle* (Gráfico 13)

Nos filhotes machos os quatro grupos experimentais tiveram níveis de prolactina plasmática semelhantes, não sendo, portanto, observadas diferenças estatisticamente significativas nesse parâmetro nos machos em DPN1 (Gráfico 14). Esses resultados de fêmeas e machos demonstram um efeito sutil dos protocolos de estresse aqui empregados sobre esse parâmetro o que talvez possa ser explicado pela fisiologia diferenciada dos filhotes e/ou pelo tipo de estresse empregado. Em humanos há uma clara relação entre o estresse por calor e os níveis de prolactina, tanto que a prolactina pode ser um indicador útil da fadiga iminente durante o estresse por calor (WRIGHT *et al.*, 2011), assim, talvez outras formas de estresse pudessem levar a alterações mais significativas nos níveis de prolactina plasmáticas nos animais desse experimento.

Esses resultados de concentração plasmática de prolactina assemelham-se aos resultados obtidos na concentração plasmática de corticosterona, outro hormônio relacionado ao estresse que em nossos filhotes não teve aumentos significativos, tendo até mesmo diminuído em filhotes machos dos grupos estressados. É possível que os dados da prolactina estejam relacionados a essa ausência do aumento da corticosterona nesses animais, uma vez que o estresse ativa o eixo HPA levando a um aumento de catecolaminas e corticosteróides que por sua vez afetam a secreção e expressão do gene da prolactina (JANSSENS *et al.*, 2008). Em fêmeas os resultados obtidos nas concentrações de prolactina e corticosterona seguiram um mesmo padrão (possível sensibilização gerada pelo estresse pré-natal) cuja semelhança talvez possa ser explicada justamente por essa relação entre o eixo HPA e a secreção de prolactina, no entanto, esse mesmo padrão não se repetiu nos filhotes machos.

5.6 Concentração de Ocitocina Central

A ocitocina é um nonapeptídeo encontrado tanto na periferia como no sistema nervoso central cuja ação encefálica está intimamente relacionada com a formação e manutenção de

comportamentos sociais nos animais, contribuindo junto com a vasopressina para o processamento de informações sociais de tal modo que vem sendo considerada o neuro-hormônio do apego (YOUNG & WANG, 2004; STRATHEARN *et al.*, 2009). É a ocitocina que propicia a emergência do comportamento maternal, promovendo a formação do vínculo entre mãe-filhote (LIM & YOUNG, 2006). Como a formação desse vínculo depende tanto da interação da mãe com o filhote como do filhote com a mãe, um desequilíbrio em uma das partes pode levar a uma quebra na formação desse vínculo que poderia estar expressa em uma possível alteração na ocitocina central dos filhotes cujas mães foram expostas ao estresse perinatal.

No entanto, nesse trabalho tanto os filhotes fêmeas como os filhotes machos expostos ao estresse perinatal não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na concentração de ocitocina central no primeiro dia de vida quando comparados aos animais que não foram expostos ao estresse perinatal (Gráficos 15 e 16). A ausência do efeito do estresse perinatal sobre esse parâmetro talvez possa ser simplesmente uma consequência da precocidade em que a coleta foi realizada, não refletindo necessariamente a falta do efeito do estresse perinatal sobre a concentração de ocitocina central em filhotes de ratos cujas mães tiveram restrição de maravalha ao longo da última semana de gestação e/ou cuja ninhada foi exposta ao gato no primeiro dia pós-parto (DPN 1).

Como já comentado, uma parte das ninhadas desse trabalho (ninhadas utilizadas para o Teste de Preferência Olfatória) submetidas aos mesmos protocolos de estresse perinatal tiveram seu comportamento maternal registrado entre DPN 2 e DPN 8. Esses registros apontaram para uma perda do padrão normal do comportamento maternal expressa por flutuações diárias nesse comportamento. A perda desse padrão altera o vínculo entre mãe-filhote o que potencialmente leva à diminuição na ocitocina central. É um cuidado adequado e estável que garante o desenvolvimento dos filhotes, em humanas crianças que crescem sem um cuidador que lhe

forneça contato físico e emocional adequado frequentemente acabam desenvolvendo problemas em estabelecer ligações sociais e em regular comportamentos sociais (FRIES, *et al.*, 2005).

No entanto, a relação entre mãe-filhotes das ninhadas aqui testadas durou apenas algumas horas (em torno de 24 horas) durante um período que embora seja crítico para o desenvolvimento do filhote não foi realizado o registro do comportamento maternal. Assim, os filhotes que tiveram seus líquores coletados para dosagem de ocitocina central não foram expostos às flutuações que ocorreram ao longo dos dias em que o comportamento maternal foi observado.

Além disso, como a coleta de ocitocina foi feita logo após o fim da última exposição ao gato dificilmente o efeito que por ventura nosso estresse pós-natal gere no vínculo mãe-filhote já estivesse alterando a concentração de ocitocina central. Já o estresse pré-natal teve um tempo maior para agir nessa relação, mas não sabemos se assim como com a concentração de ocitocina também não foi capaz de levar a alterações no comportamento maternal dentro dessas 24 horas pós-parto (entre DPN 0 e DPN1). Enfim, não há alteração na concentração de ocitocina central de filhotes fêmeas e machos no primeiro dia de vida e se por ventura nosso protocolo seja capaz de desencadear essas alterações elas ocorrem numa fase posterior do desenvolvimento dos filhotes.

6. CONCLUSÕES

A primeira conclusão que se pode chegar com os dados apresentados nesse trabalho é a validade do modelo de estresse perinatal aqui empregado em perturbar o desenvolvimento normal de filhotes de ratos. Tanto as fêmeas como os machos apresentaram mudanças tanto nos parâmetros que pretendiam avaliar a relação mãe filhote como nos que testavam a capacidade dos estresses empregados em influir na secreção de hormônios relacionados com as respostas ao estresse em animais ainda dentro do Período Hiporresponsivo ao estresse, o que demonstra a robustez desses estresses nas situações em que foram empregados.

Tanto o estresse pré-natal como o estresse pós-natal foram capazes de desencadear grandes alterações no reconhecimento da mãe pelos filhotes (filhotes fêmeas e filhotes machos) no nono dia de vida, pois quando testados através do Teste de Preferência Olfatória tanto os animais submetidos ao estresse pré-natal como aqueles submetidos ao estresse pós-natal ou à combinação de ambos apresentaram uma perda na preferência olfatória em relação ao odor maternal demonstrada por mudanças ou na frequência de chegada às maravalhas (apenas nas fêmeas) ou no tempo em que esses animais ficaram entre os lados da caixa (apenas em fêmeas e machos dos grupos *Estresse Pós* e *Estresse Pré+Pós*) ou ainda no tempo em que ficaram diretamente sobre as maravalhas (em fêmeas e machos).

De modo contrário ao que vimos no Teste de Preferência Olfatória, ao menos no primeiro dia de vida, a concentração de ocitocina central que constitui outro importante parâmetro relacionado à relação mãe-filhote não foi alterada pelo estresse perinatal. Interessante seria que além das coletas de líquido feitas em DPN 1 tivessem sido feitas coletas em DPN 9, já que as alterações no teste comportamental (Teste de Preferência Olfatória) foram observadas nesse dia.

O modelo de estresse perinatal aqui empregado teve um efeito peculiar sobre a secreção de hormônios relacionados com as respostas ao estresse em filhotes de um dia de vida. Esperávamos que o modelo fosse estressante o suficiente para levar a aumentos desses hormônios superando, dessa forma, a barreira da hiporresponsividade. No entanto, o que observamos foram resultados por vezes opostos ao esperando. Em machos, por exemplo, o estresse perinatal provocou uma diminuição na concentração de corticosterona plasmática desses filhotes: tanto os grupos *Estresse Pré*, *Estresse Pós* e *Estresse Pré+Pós* tiveram uma redução da corticosterona quando comparados aos machos do grupo *Controle*.

Nas fêmeas não ocorreu essa diminuição, embora o estresse pré-natal e o estresse pós-natal em separados tenham levado a uma tendência de diminuição na concentração de corticosterona plasmática quando comparados ao grupo *Controle*. Ainda nas fêmeas, a associação de ambos os estresses (grupo *Estresse Pré+Pós*) levou a uma tendência de aumento da corticosterona quando comparadas às fêmeas do grupo *Controle* de modo que em relação aos grupos *Estresse Pré* e *Estresse Pós* o grupo *Estresse Pré+Pós* apresentou um aumento estatisticamente significativo nesse parâmetro em DPN 1.

A concentração plasmática de corticosterona nas fêmeas é um resultado curioso que possivelmente indique que o estresse pré-natal sensibilizou esses animais de modo que quando essas mesmas fêmeas são re-expostas a um evento estressor (exposição ao gato em DPN 1 no grupo *Estresse Pré+Pós*) a tendência de inibição na produção de glicocorticóides é substituída por uma aumento nesses hormônio em relação aos dois grupos de animais (*Estresse Pré* e *Estresse Pós*) que foram expostos a um único evento estressor. Essa possibilidade de sensibilização é reforçada quando analisamos os resultados da concentração plasmática de prolactina, pois nessas fêmeas os resultados seguiram o mesmo padrão da corticosterona: o estresse pré-natal e o estresse pós-natal em separados levaram a uma tendência de diminuição na concentração de prolactina plasmática quando comparados ao grupo *Controle*. Já a

associação de ambos os estresses (grupo *Estresse Pré+Pós*) levou a uma tendência de aumento da prolactina dessas fêmeas quando comparadas às fêmeas do grupo *Controle* de modo que em relação aos grupos *Estresse Pré* e *Estresse Pós* o grupo *Estresse Pré+Pós* teve um aumento estatisticamente significativo nesse parâmetro em DPN 1.

Já nos filhotes machos o estresse perinatal não foi capaz de gerar alterações na concentração de prolactina plasmática em DPN 1, pois todos os grupos experimentais tiveram concentrações semelhantes desse hormônio. Assim, ao contrário das fêmeas cujas concentrações de corticosterona e prolactina seguiram uma mesma tendência, nos machos o modelo de estresse aqui empregado foi capaz de modificar apenas os níveis de corticosterona. O que demonstra que mesmo em animais muito jovens já é possível observar que fêmeas e machos podem ter respostas diferentes a mesmas situações e estímulos.

Por fim, com esse modelo de estresse mais uma vez foi demonstrado o papel crítico das primeiras horas de vida no desenvolvimento normal dos filhotes já que o estresse agudo em DPN1 isoladamente já foi suficiente para desencadear alterações comportamentais e endócrinas em filhotes de ratos. Além disso, com o presente modelo mais uma vez demonstrou-se a robustez do estresse gerado pela presença do predador (gato) em ratos.

7. REFERÊNCIAS

ALBERT, J. & WALSH, M.L. Aggression in the lactating female rat: the normal decline is not dependent on the physical development of the pups. **Physiology & Behavior**, **58** (3), p. 477-481, 1995.

APFELBACH, R.; BLANCHARD, C.D.; BLANCHARD, R.J.; HAYES, R., MCGREGOR, I.S. The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, **29**, p. 1123-1144, 2005.

BLANCHARD, R.J & BLANCHARD, D.C. Bringing natural behaviors into the laboratory: a tribute to Paul MacLean. **Physiology & Behavior**, **79**, p. 515– 524, 2003.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBELC, G.; BLANCHARD, R.J. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, **27**, p. 1177-1185, 2003.

BRUNSON, K.L.; AVISHAI-ELINER, S.; HATALSKI, C.G.; BARAM, T.Z. Neurobiology of the stress response early in life: evolution of a concept and the role of corticotrophin releasing hormone. **Molecular Psychiatry**, **6**, p.647-656, 2001.

CALDJI, C.; LIU, D.; SHARMA, S.; DIORIO, J.; FRANCIS, D.; MEANEY, M.J.; PLOTSKY, P.M. Development of Individual Differences in Behavioral and Endocrine Responses to Stress: Role of the Postnatal Environment. **Handbook of physiology: coping with environment**. New York: Oxford Univ Press, p. 271-292, 2001.

CALIGIONI, C.S. & FRANCI, C.R. Oxytocin secretion induced by osmotic stimulation in rats during the estrous cycle and after ovariectomy and hormone replacement therapy. **Life Sciences**, **71**, p. 2821-2831, 2002.

CHRISTIAN, H.C.; CHAPMAN, L.P.; MORRIS, J.F. Thyrotrophin-releasing hormone, vasoactive intestinal peptide, prolactin-releasing peptide and dopamine regulation of prolactin secretion by different lactotroph morphological subtypes in the rat. **Journal of Neuroendocrinology**, **19**, p. 605-613, 2007.

CONSIGLIO, A.R. & LUCION, A.B. Technique for collecting cerebrospinal fluid in the cisterna magna of non-anesthetized rats. **Brain Research Protocols**, **5** p. 109-114, 2000.

DI MARCO, P.N.; . GHISALBERTI, A. V.; MARTIN, C.E.; OLIVER, I.T. Perinatal changes in liver corticosterone, serum insulin and plasma glucagon and corticosterone in the rat. **European Journal of Biochemistry**, **87(2)**, p. 243-247, 1978.

FEDERENKO, L.S. & WADHWA, P.D. Women's mental health during pregnancy influences fetal and infant developmental and health outcomes. **CNS Spectr.**, **9**, p. 198-206, 2004.

FENOGLIO, K. A.; BRUNSON, K. L.; BARAM, T. Z. Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: functional and molecular aspects. **Frontiers in Neuroendocrinology**, **27**, p. 180-192, 2006.

FERREIRA, Charles Francisco. **Efeitos do Estresse Perinatal sobre a Relação Mãe-Filhotes de Ratas**. 2010. 126f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2010.

FRIES, A.B.W.; ZIEGLER, T.E.; KURIAN, J.R.; JACORIS, S.; POLLAK, S.D. Early experience in humans is associated with changes in neuropeptides critical for regulating social behavior. **PNAS**, **102 (47)**, p. 17237-17240, 2005.

GORDDON, I.; ZAGOORY-SHARON, O.; LECKMAN, J.F.; FELDMAN, R. Oxytocin, cortisol, and triadic family interactions. **Physiology & Behavior**, **101**, p. 679-684, 2010.

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

GROTA, L.J. & ADER, R. Behavior of lactating rats in a dual-chambered maternity cage. **Hormones and Behavior**, **5 (4)**, p. 275-282, 1974.

GUTTELING, B. M.; DE WEERTH, C.; WILLEMSSEN-SWINKELS, S. H.; HUIZINK, A. C.; ULDER, E. J.; VISSER, G. H.; BUITCLAAR, J. K. The effects of prenatal stress on temperament and problem behavior of 27-month-old toddlers. **Eur Child Adolesc Psychiatry**, **14**, p. 41-51, 2005.

HANDA, R.J.; BURGESS, L.H.; KERR, J.E.; O'KEEFE, J.A. Gonadal Steroid Hormone Receptors and Sex Differences in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. **Hormones and Behavior**, **28 (4)**, 1994.

HERMAN, J.P. & CULLINAN, W. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, **20 (2)**, p. 78-84, 1997.

HERRENKOHL, L.R. Prenatal Stress Reduces Fertility and Fecundity in Female Offspring. **Science**, **206** (30), p. 1097-1099, 1979.

HOLT, P.G & OLIVER, I.T. Plasma Corticosterone Concentrations in the Perinatal Rat. **Biochemical Journal**, **108** (2), p. 339-341, 1968.

JANSSENS, K.; BOUSSEMAERE, M.; WAGNER S.; KOPKA, K.; DENEFF, C. β_1 -adrenoceptor expression in rat anterior pituitary may be constitutively active. Inverse agonism of CGP20712A on basal 3', 5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate levels. **Endocrinology**, **149** (5), p. 2391-2402, 2008.

JOHNSTONE, H.A.; WIGGER, A.; DOUGLAS, A.J.; NEUMANN, I.D.; LANDGRAF, R.; SECKL, J.R.; RUSSELL, J.A. Attenuation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Stress Responses in Late Pregnancy: Changes in Feedforward and Feedback Mechanisms. **Journal of Neuroendocrinology**, **12** (8), p. 811-822, 2000.

KJAER, S.L.; WEGENER, G.; ROSENBERG, R.; LUND, S.P.; HOUGAARD, K.S. Prenatal and adult stress interplay - behavioral implications. **Brain Research**, **1320**, p. 106-113, 2010.

KITAGAWA, S.; ABE, N.; SUTOH, M.; KASUYA, E.; SUGITA, S.; AOYAMA, M.; YAYOU, K. Effect of intracerebroventricular injections of prolactin-releasing peptide on prolactin release and stress-related responses in steers. **Animal Science Journal**, **82**, p. 314-319, 2011.

LÉONHARDT, M.; MATTHEWS, S.G.; MEANEY, M.J.; WALKER, C.D. Psychological stressors as a model of maternal adversity: Diurnal modulation of corticosterone responses and changes in maternal behavior. **Hormones and Behavior**, **51**, p. 77-88, 2007.

LEON, M. Catecholaminergic contributions to early learning. **Advances in Pharmacology**, **42**, p. 961-964, 1998.

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

LIM, M.M.; YOUNG, L. Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. **Hormones and Behavior**, **50**, p. 506-517, 2006.

MACRÌ, S.; ZORATTO, F.; LAVIOLA, G. Early-stress regulates resilience, vulnerability and experimental validity in laboratory rodents through mother-offspring hormonal transfer. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, **35**, p. 1534-1543, 2011.

MATTHEWS, S.G. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Trends Endocrinol. Metab.**, **13**, p. 373-380, 2002.

McLEAN, J.H.; HARLEY, C.W.; DARBY-KING, A.; YUAN, Q. pCREB in the neonate rat olfactory bulb is selectively and transiently increased by odor preference-conditioned training. **Learning & Memory**, **6**, p. 608-618, 1999.

McGREGOR, I.S.; HARGREAVES, G.A.; APFELBACH, R.; HUNT, G.E. Neural Correlates of Cat Odor-Induced Anxiety in Rats: Region-Specific Effects of the Benzodiazepine Midazolam. **The Journal of Neuroscience**, **24** (17), p. 4134-4144, 2004.

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

MEANEY, M.J.; BHATNAGAR, S.; LAROCQUE, S.; McCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V.; PLOTSKY, P.M. Individual Differences in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Stress Response and the Hypothalamic CRF System. **Annals of the New York Academy of Sciences** (697), p. 70-85, 1993.

MEANEY, M.J.; SZYF, M. Maternal care as a model for experience-dependent chromatin plasticity? **Trends in Neurosciences**, **28** (9), p. 456-463, 2005.

MEERLO, P.; HORVATH, K.M.; NAGY, G.M.; BOHUS, B.; KOOLHAAS, J.M. The Influence of Postnatal Handling on Adult Neuroendocrine and Behavioural Stress Reactivity. **Journal of Neuroendocrinology**, (11), p. 925-933, 1999.

MOORE, C.L. Maternal behavior in rats is affected by hormonal condition of pups. **Journal of Comparative and Physiological Psychology** **96**, p. 123-129, 1982.

NEUMANN, I.D. Alterations in behavioral and neuroendocrine stress coping strategies in pregnant, parturient and lactating rats. **Progress in Brain Research**, **133**, p. 143-152, 2001.

OOMEN, C. A.; GIRARDI, C.E.N.; CAHYADI,R.; VERBEEK, E.C.; KRUGERS,H.; JOËLS, M. & LUCASSEN, P.J. Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats. **PLoS ONE**, **4**, p. 1-13, 2009.

PATIN, V., LORDI, B., VINCENT, A., THOUMAS, J.L., VAUDRY, H. & CASTON, J. Effects of prenatal stress on maternal behavior in the rat. **Developmental Brain Research**, **139**, p.1- 8, 2002.

PAUK, J.; KUHN, C.M.; FIELD, T.M.; SCHANBERG, S.M. Positive effects of tactile versus kinesthetic or vestibular stimulation on neuroendocrine and ODC activity in maternally-deprived rat pups. **Life Sciences**, **39 (22)**, p. 2081-2087, 1986.

PORTER, R. H. Olfaction and human kin recognition. **Genetica** **104**. 1999.

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

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

RAINEKI, C.; SOUZA, M. A.; SZAWKA, R. E.; LUTZ, M. L.; VASCONCELLOS, L. F. T.; SANVITTO, G. L.; ISQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R. M.; CAMMAROTA, M.; LUCION, A.B. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: Involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. **Neuroscience**, **159 (1)**, p. 31-38, 2009.

REIS, Adolfo Rodrigues. **Efeito da Manipulação Neonatal sobre o Sinal de BDNF no Bulbo Olfatório de Ratos**. 2010. 80f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2010.

RIMA, B.N.; BARDI, M.; FRIEDENBERG, J.M.; CHRISTON, L.; KARELINA, K.E.; LAMERT, K.G.; KINSLEY, C. Reproductive Experience and the Response of Female Sprague–Dawley Rats to Fear and Stress. **Comparative Medicine**, **59 (5)**, p. 437-443, 2009.

SAPOLSKY, R.M. & MEANEY, M.J. Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. **Brain Research Reviews**, **11(1)**, p. 65-76, 1986.

SAPOLSKY, R.M.; PACKAN, D.R.; VALE, W.W. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: in vitro demonstration. **Brain Research**, **453** (1-2), p.367-371, 1988.

SCHANBERG, S.M. & KUHN, C.M. Enzymes and neurotransmitters in mental disease. P. 373-393. In.: USDIN, E.; SOURKES, T.L. & YODIM, M.B.H.. (ed.). **Jhon Wilery and Sons, Ltd.** (New York): 1980.

STERN, J.M. & JOHNSON, S. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. **Physiology & Behavior**, **47** (5), p. 993-1011, 1990.

STRATHEARN, L.; FONAGY, P.; AMICO, J.; MONTAGUE, P.R. Adult attachment predicts maternal brain and oxytocin response to infant cues. **Neuropsychopharmacology**, **34**, p. 2655-2666, 2009.

SWINNEN, M.; BOUSSEMAERE, M.; DENEFC. Stimulation and inhibition of prolactin release by prolactin-releasing peptide in rat anterior pituitary cell aggregates. **Journal of Neuroendocrinology**, **17**, p. 379-386, 2005.

SULLIVAN, R.M. Developing a sense of safety. The neurobiology of neonatal attachment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **1008**, p. 122-131, 2003.

SULLIVAN, R.M.; WILSON, D.A. Molecular Biology of Early Olfactory Memory. **A Review. Learning & Memory**, **10**, p. 1-4, 2003.

YAMADA, T.; MOCHIDUKI, A.; SUGIMOTO, Y.; SUZUKI, Y.; ITOI, K.; INOUE, K. Prolactin-releasing peptide regulates the cardiovascular system via corticotrophin-releasing hormone. **Journal of Neuroendocrinology**, **21**, p. 586-593, 2009.

YOUNG, L.J.; WANG, Z. The neurobiology of pair bonding. **Nature Neuroscience**, **10**, p. 1048-1054, 2004.

YUAN, Q.; HARLEY, C. W.; BRUCE, J.C.; DARBY-KING, MCLEAN.; J.H. Isoproterenol increase CREB phosphorylation and olfactory nerve-evoked potentials in normal and 5-HT-depletion olfactory bulbs in rat pups only at dose that produce odor preference learning. **Learning & Memory**, **7**, p. 413-421, 2000.

WAKABAYASHI, I.; ARIMURA, A.; SCHALLY, A.V. Effect of Pentobarbital and Ether Stress on Serum Prolactin Levels in Rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **137**, p. 1189-1193, 1971.

WALKER, C.-D., DESCHAMPS, S., PROULX, K., TU, M., SALZMAN, C., WOODSIDE, B., LUPIEN, S., GALLO-PAYET, N., RICHARD, D. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**. **29**. 2004

WARD, O.B.; WARD, I.L.; DENNING, J.H.; FRENCH, J.A.; HENDRICKS, S.E. Postparturitional testosterone surge in male offspring of rats stressed and/or fed ethanol during late pregnancy. **Hormones and Behavior**, **41**, p. 229-235, 2002.

WATSON, J. B.; MEDNICK, S. A.; HUTTUNEN, M.; WANG, X. Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. **Dev Psychopathol** **11**, p. 457-466, 1999.

WRIGHT, H.E.; SELKIRK, G.A.; RHIND, S.G.; McLELLAN, T.M. Peripheral markers of central fatigue in trained and untrained during uncompensable heat stress. **European Journal of Applied Physiology**, Julho, 2011.

ANEXO I

Abaixo está a ficha utilizada para o registro do comportamento maternal. O registro foi feito diariamente entre o segundo e o oitavo dia pós-parto, em cada um desses sete dias realizaram-se quatro sessões de observação do comportamento maternal sendo que dessas quatro três eram realizadas no ciclo claro e uma no ciclo escuro dos animais. Em cada uma das sessões observava-se o que a fêmea lactante estava fazendo em 25 diferentes momentos, assim, os registros eram pontuais: anotava-se o que a mãe estava fazendo no exato momento em que se olhava para a caixa residência. Após três minutos o protocolo se repetia, anotando novamente o que o animal estava fazendo naquele instante. Assim, cada uma das quatro sessões durava 72 minutos.

RATA: _____ Data do parto: _____ Grupo: _____ Ninho: _____ DATA: _____ DIAS PP: _____

IIG - Igh crouch (amamentando/ dorso bem arqueado)
 LW - Low crouch (amamentando/ dorso pouco arqueado)
 SUP - Supone post. (amamentando de lado ou de costas)
 L - Lambendo filhotes
 HG/L - Amamentando com o dorso bem arqueado e lambendo

CN - Construção do ninho
 OFF - Mãe fora do ninho/caixa
 R - Recolhida de filhotes
 FFN - Filhotes fora do ninho
 MN - No ninho sem posição de amamentação

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

DATA: _____ DIAS PP: _____

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

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

Figura 13. Ficha utilizada para o registro do comportamento maternal.