



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

**PROVOCAÇÃO SOCIAL NA DÍADE MÃE-FILHOTE –  
EFEITOS NA ONTOGENIA DO COMPORTAMENTO SOCIAL  
NA PROLE**

Tese de Doutorado

**Thiago Pereira Henriques**

Porto Alegre, 2014

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

**PROVOCAÇÃO SOCIAL NA DÍADE MÃE-FILHOTE –  
EFEITOS NA ONTOGENIA DO COMPORTAMENTO SOCIAL  
NA PROLE**

**Thiago Pereira Henriques**

**Orientadora: Profa. Dra. Rosane Gomez  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Márcia Giovenardi**

Tese apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas:  
Fisiologia como requisito para  
obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, 2014

*À minha família – aos que estão entre nós e aos que ficarão para sempre em nossas mais ternas memórias (Nico e avôs Alvarino e Hélio).*

## *AGRADECIMENTOS*

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo curso gratuito e de excelente qualidade. Agradeço também ao CPNq, pelo apoio financeiro, o qual até possibilitou a minha participação em eventos internacionais.

Aos(às) Professores(as) do PPG, Adriane Belló-Klein, Alex Sander da Rosa Araújo, Ilma Simoni Brum, Luiz Carlos Rios Kucharski e Maria Flávia Marques Ribeiro, os quais sempre foram muito acessíveis, gentis, compreensivos e sensatos, sempre dispostos a me ajudar a superar os obstáculos e empecilhos que surgiam. Graças a eles recebi uma orientação maravilhosa, permitindo que eu pudesse concluir meu doutorado.

À minha orientadora Rosane Gomez e à minha co-orientadora Márcia Giovenardi por terem me acolhido como aluno, que foi a melhor coisa que ocorreu no meu doutorado. Elas são excelentes profissionais e pessoas maravilhosas, as quais se empenharam muito para me ajudar em todos aspectos possíveis da minha formação. Além de toda a ajuda e paciência, as Professoras sempre me trataram de forma gentil e me fizeram sentir valorizado, coisas fundamentais para manter um aluno de doutorado motivado e produtivo. Devo muito a elas o meu doutorado, essas palavras são poucas para descrever o quanto sou grato às minhas queridas orientadoras.

A todas pessoas que participaram dos experimentos desta tese, especialmente: Ana Raquel Karkow, Caroline Veiga, Cátia Corrêa, Felipe Stigger, Grace Pardo, Luisa Diehl, Marcelo de Souza e Márcio Alves. Sou muito grato pela disponibilidade, boa vontade e empenho de todos, pois foram fundamentais para tornar este trabalho possível. Agradeço também àqueles colegas de laboratório que foram camaradas, pacientes, compreensivos e éticos, mesmo nos momentos difíceis.

Ao Douglas e ao Tiago (Action Consultoria) pelo ótimo apoio estatístico.

Aos caros colegas de PPG e de Departamento, pela convivência amigável e pela disponibilidade de ajudar quando preciso (por exemplo, leituras de emergência de placas de ELISA!). Agradeço especialmente à Taína Scheid, por acolher e valorizar minha participação no trabalho dela.

Aos estimados amigos que fiz ao longo da Graduação e da Pós-Graduação, bem como aos amigos fora do meio acadêmico (os quais não caberia listar, com receio de esquecer algum nome!).

À minha querida família: meus pais Hélio e Elda, meus avós, meus tios (incluindo a família da minha tia Sílvia), meus primos (principalmente o Filipe, que também é um grande amigo), meus sogros Carlos e Isolde e também meus queridos cachorros Nico (*in memoriam*), Quico e Zulu. Agradeço muito por todo o carinho, apoio e estímulo incondicionais, assim como pela paciência e compreensão da minha ausência e estresse durante o doutorado.

Finalmente, agradeço a uma pessoa muito especial e amada, que me acompanha desde a minha Graduação até agora, a Luisa! Ela teve uma participação de extrema importância não apenas no meu doutorado, como também tem na minha vida. A Luisa é um dos meus maiores modelos inspiradores de profissional e de ser humano. Sou muito feliz por ter essa mulher maravilhosa ao meu lado, sou muito grato por todo o amor, carinho, amizade, companheirismo e por sempre acreditar em mim. Agradeço muito pela paciência, compreensão e apoio nos momentos difíceis, e também por vibrar e compartilhar as alegrias dos momentos felizes.

*"Nós nunca paramos de investigar. Nunca estamos satisfeitos como se soubéssemos o suficiente. Toda pergunta que respondemos leva a outra pergunta. Isso se tornou o maior truque de sobrevivência da nossa espécie."*

*Desmond Morris*

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	VIII
Lista de Figuras.....	IX
Lista de Tabelas.....	XI
Resumo.....	XII
Abstract.....	XIII
1. Introdução.....	2
1.1 Estresse e Respostas Hormonais.....	3
1.2 A Influência no Ambiente Precoce no Desenvolvimento de Neonatos.....	6
1.3 Comportamentos Sociais de Neonatos a Adultos.....	9
1.3.1 Interações Mãe-Filhote.....	10
1.3.2 Formação de Vínculo em Neonatos.....	12
1.3.3 Comportamento de Brincadeira em Juvenis.....	14
1.3.4 Interações Sociais em Adultos.....	18
1.3.5 Comportamento Maternal.....	22
1.3.5.1 O Paradigma de Provocação Social.....	25
2. Hipótese.....	28
3. Objetivos.....	30
3.1 Gerais.....	30
3.2 Específicos.....	30
4. Material e Métodos.....	33

4.1 Animais.....	33
4.2 Paradigma de provocação social em lactantes.....	35
4.3 Análise dos Efeitos da Provocação Social sobre a Relação Mãe-Filhote e nas Respostas Hormonais em Filhotes.....	37
4.3.1 Registro do comportamento maternal.....	37
4.3.2 Teste de preferência olfatória em filhotes.....	38
4.3.2.1 Coleta de sangue.....	40
4.3.3 Avaliação motora e pesagem dos filhotes.....	40
4.4 Análise dos Efeitos da Provocação Social sobre Parâmetros Comportamentais e Hormonais na Prole Juvenil.....	43
4.4.1 Registro da abertura ocular em neonatos, desmame e sexagem da prole...	43
4.4.2 Registro do comportamento de brincadeira.....	43
4.4.3 Coleta de sangue.....	44
4.5 Análise dos Efeitos da Provocação Social sobre Parâmetros Comportamentais e Hormonais na Prole Adulta.....	45
4.5.1 Teste do campo aberto.....	45
4.5.2 Teste do labirinto em cruz elevado.....	46
4.5.3 Teste de interação social.....	46
4.5.4 Estresse por contenção.....	49
4.5.4.1 Coleta de sangue.....	49
4.6 Análises hormonais.....	49
5. Aspectos Éticos.....	51
6. Análise Estatística.....	53



7. Resultados.....	55
7.1 Efeitos da Provocação Social sobre a Relação Mãe-Filhote e nas Respostas Hormonais em Filhotes.....	55
7.2 Efeitos da Provocação Social sobre Parâmetros Comportamentais e Hormonais na Prole Juvenil.....	62
7.3 Efeitos da Provocação Social sobre Parâmetros Comportamentais e Hormonais na Prole Adulta.....	66
8. Discussão.....	75
9. Conclusões.....	100
10. Referências Bibliográficas.....	103
Anexo I: Planilhas para registro do comportamento maternal e para registro do comportamento de brincadeira.....	144
Anexo II: Carta de aprovação CEUA-UFRGS.....	145
Anexo III: Artigo submetido: Social Instigation in Lactating Dams Alters Mother- Infant Relationship and Hormonal Responses in Rat Pups.....	146

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ACTH</b> .....	Hormônio Adrenocorticotrópico
<b>ANOVA</b> .....	Análise de Variância
<b>AVP</b> .....	Arginina-Vasopressina
<b>CORT</b> .....	Corticosterona
<b>CRH</b> .....	Hormônio Liberador de Corticotropina
<b>DA</b> .....	Dopamina
<b>GABA</b> .....	Ácido Gama-Aminobutírico
<b>HHA</b> .....	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
<b>LC</b> .....	<i>Locus ceruleus</i>
<b>NA</b> .....	Noradrenalina
<b>OT</b> .....	Ocitocina
<b>PP</b> .....	Dia pós-parto
<b>PRL</b> .....	Prolactina
<b>PVN</b> .....	Núcleo Paraventricular (Hipotalâmico)
<b>mRNA</b> .....	Ácido Ribonucleico mensageiro
<b>SNC</b> .....	Sistema Nervoso Central
<b>SON</b> .....	Núcleo Supraóptico (Hipotalâmico)

## LISTA DE FIGURAS

### Material e Métodos

<b>Figura 1.</b> Paradigma de provocação social em lactantes.....	36
<b>Figura 2.</b> Exemplos de comportamentos maternos.....	38
<b>Figura 3.</b> Teste de preferência olfatória em filhotes.....	40
<b>Figura 4.</b> Teste de endireitamento em filhotes.....	41
<b>Figura 5.</b> Teste de geotaxis negativo em filhotes.....	42
<b>Figura 6.</b> Teste de campo aberto em filhotes.....	42
<b>Figura 7.</b> Comportamento de brincadeira em juvenis.....	44
<b>Figura 8.</b> Teste de interação social em adultos.....	48
<b>Figura 9.</b> Exemplos de comportamentos registrados durante o teste de interação social.....	48

### Resultados

<b>Figura 10.</b> Teste de preferência olfatória em filhotes (PP7).....	57
<b>Figura 11.</b> Hormônios plasmáticos em filhotes (PP7).....	59
<b>Figura 12.</b> Comportamentos de brincadeira em juvenis (PP30).....	63
<b>Figura 13.</b> Comportamento social de cheirar em juvenis (PP30).....	64
<b>Figura 14.</b> Hormônios plasmáticos em juvenis (PP31).....	65
<b>Figura 15.</b> Interações não-agressivas no teste de interação social em adultos (PP87).....	69
<b>Figura 16.</b> Soma dos comportamentos agressivos no teste de interação social em adultos (PP87).....	70
<b>Figura 17.</b> Comportamentos não-sociais no teste de interação social em adultos (PP87).....	71

<b>Figura 18.</b> Hormônios plasmáticos após estresse por contenção em adultos (PP90).....	73
--	----

#### **Anexos**

<b>Figura A.</b> Planilha de registro cumulativo do comportamento materno.....	144
--	-----

<b>Figura B.</b> Planilha de registro do comportamento de brincadeira.....	144
--	-----

## LISTA DE TABELAS

### Resultados

<b>Tabela 1.</b> Frequências cumulativas de comportamentos maternos (PP3, PP4 e PP6).....	56
<b>Tabela 2.</b> Teste motor no campo aberto em filhotes (PP7).....	60
<b>Tabela 3.</b> Teste motor de endireitamento (latência) em filhotes (PP7).....	60
<b>Tabela 4.</b> Teste motor de geotaxis negativo (respostas positivas e latências) em filhotes (PP7).....	61
<b>Tabela 5.</b> Pesagem das ninhadas (PP7).....	61
<b>Tabela 6.</b> Teste do campo aberto em ratos adultos (PP80).....	67
<b>Tabela 7.</b> Teste do labirinto em cruz elevado em ratos adultos (PP83).....	68

## RESUMO

As duas primeiras semanas de vida em ratos são críticas para o desenvolvimento, pois os animais são suscetíveis a influências ambientais. Diversos parâmetros neuroendócrinos e comportamentais podem ser influenciados, a curto e a longo prazo, pelas interações com a mãe, assim como por estressores. Entre esses estressores, um ambiente precoce socialmente aversivo pode alterar os comportamentos sociais, a ansiedade e as respostas neuroendócrinas ao estresse em adultos. O foco deste trabalho foi investigar o impacto do paradigma de provocação social na díade mãe-filhote sobre os comportamentos sociais e as respostas hormonais da prole em três idades. A provocação social foi realizada nos dias pós-natais (PP) 2 e 5. O comportamento maternal das lactantes foi registrado em PP3, 4, e 6. Os filhotes foram submetidos ao teste de preferência olfatória em PP7, o comportamento de brincadeira em juvenis foi registrado em PP30 e os ratos adultos (a partir de PP80) foram submetidos aos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado e interação social. Os adultos também foram expostos ao estresse por contenção (PP90). Os resultados mostraram que a intervenção aumentou a presença das mães no ninho. A intervenção reduziu o tempo gasto pelos filhotes no lado da maravalha do ninho, reduziu os níveis plasmáticos de ocitocina e prolactina, porém, aumentou os níveis de arginina-vasopressina. Nos juvenis, a intervenção reduziu a brincadeira de luta e os níveis plasmáticos de arginina-vasopressina. Nos adultos, a intervenção não levou a alterações na ansiedade e nas respostas hormonais ao estresse, porém, reduziu a latência para os comportamentos agressivos e os níveis plasmáticos basais de ocitocina. Conforme observado nas lactantes e nos neonatos, a provocação social levou a uma alteração da relação mãe-filhote, afetando, também, hormônios relacionados ao comportamento afiliativo em neonatos. Da mesma forma, a redução da brincadeira de luta em juvenis expostos à intervenção neonatal pode ter ocorrido devido à alteração da arginina-vasopressina, hormônio envolvido nesse comportamento. Apesar da intervenção não ter alterado a ansiedade e as respostas hormonais ao estresse em adultos, afetou de maneira específica o comportamento agressivo, reduzindo a sua latência. Este achado pode ser relacionado à ocitocina diminuída, conhecida por ter efeitos antiagressivos. Logo, sugerimos que a provocação social altere, tanto de forma precoce quanto duradoura, os comportamentos sociais, assim como os hormônios responsáveis pela modulação desses parâmetros.

**Palavras-chave:** provocação social; intervenção neonatal; relação mãe-filhote; juvenil; adulto; comportamento social; ocitocina; arginina-vasopressina; prolactina; corticosterona.

## ABSTRACT

The first two weeks of life in rats are critical for development because the animals are susceptible to environmental influences. A variety of neuroendocrine and behavioral parameters may be influenced in a short or long lasting way by the interactions with the mother as well as by stressors. Among these stressors, a socially aversive environment may alter social behaviors, anxiety and neuroendocrine responses to stress in adult subjects. The focus of this work was to investigate the impact of the social instigation paradigm on mother-litter dyad over social behaviors and hormonal responses in rats at 3 ages. Social instigation was carried out at postpartum days (PP) 2 and 5. Maternal behavior from lactating rats was registered at PP3, 4 and 6. Pups were submitted to the nest odor preference test at PP7, play behavior was registered in juveniles at PP30, and adult rats (starting at PP80) were submitted to the open field, elevated plus maze and social interaction tests. Adult rats were also submitted to restraint stress. Results show that the intervention increased presence in nest of lactating rats. The intervention reduced time spent on nest bedding side in pups, decreased oxytocin and prolactin plasma levels, however, increased arginine-vasopressin levels. Juveniles submitted to the neonatal intervention had reduced play-fighting frequencies and arginine-vasopressin levels. In adults, the intervention has not altered anxiety and hormonal responses to stress, however, it decreased the latency for aggressive behaviors, as well as oxytocin basal levels. According to the outcomes observed in lactating rats and pups, social instigation altered mother-infant relationship, as well as levels of hormones involved in affiliative behavior in neonatal rats. Similarly, the reduced play-fighting in juveniles exposed to the intervention may be related to the decreased arginine-vasopressin levels, which is a hormone involved in such behavior. In spite of the intervention having not altered the anxiety and hormonal responses to stress in adult rats, it altered in a specific manner the aggressive behavior, reducing its latency. This finding may be related to the decreased oxytocin levels, which is a hormone known to have antiaggressive effects. Thus, we suggest that social instigation impairs early to late social behaviors, as well as the hormones responsible for the modulation of such parameters.

**Keywords:** social instigation; neonatal intervention; mother-infant relationship; juvenile; adult; social behavior; oxytocin; arginine-vasopressin; prolactin; corticosterone.

*Introdução*

---



## 1. Introdução

A formação e a manutenção das relações sociais são processos complexos que envolvem vários níveis de processamento de informação no encéfalo. Primeiro, o organismo deve ter motivação para se aproximar e interagir com outro indivíduo. Então, o animal deve ser capaz de identificar o indivíduo baseado em dicas sociais por meio da formação de memórias sociais (LIM & YOUNG, 2006). A habilidade de distinguir/reconhecer um indivíduo familiar dos não-familiares, incluindo o reconhecimento entre mãe e prole, entre parceiros e entre um indivíduo subordinado e um dominante em uma hierarquia, é a base para as relações sociais em todas as espécies (BIELSKY & YOUNG, 2004; FERGUSON et al., 2002). Finalmente, dadas as condições apropriadas, um vínculo pode ser formado, levando a uma interação preferencial com aquele indivíduo (LIM & YOUNG, 2006). Os vínculos sociais podem se formar entre pais e filhotes, entre dois adultos ou entre outros membros do grupo, sendo adaptativo para a sobrevivência da espécie (CARTER & KEVERNE, 2002; INSEL & WINSLOW et al., 1998). Entre os mamíferos, existem espécies que vivem em diversos graus de sociabilidade, desde solitários até altamente sociais, como ratos, chimpanzés e humanos. Devido à característica humana de pertencer ao grupo de alta sociabilidade, torna-se relevante estudar os mecanismos associados às relações sociais (CHOLERIS et al., 2004).

Apesar de diferentes moléculas mediadoras estarem envolvidas nos comportamentos sociais, os hormônios ocitocina (OT) e arginina-vasopressina (AVP) desempenham papéis-chave nesses comportamentos (HEINRICHS & DOMES, 2008; NEUMANN & LANDGRAF, 2012; VEENEMA, 2012). A OT e a AVP, as quais são sintetizadas nos núcleos hipotalâmicos paraventricular (PVN) e supraóptico (SON), são liberadas não apenas na circulação sistêmica pela neuro-hipófise, mas também centralmente para agirem em seus próprios receptores (OT-R e, principalmente,  $V_{1A}$ -R) amplamente expressos no sistema

nervoso central (SNC) (BARBERIS & TRIBOLLET, 1996; GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001). Além do PVN e do SON, a OT e a AVP também são sintetizadas por outros neurônios hipotalâmicos e extra-hipotalâmicos, os quais liberam esses neuropeptídeos independentemente no encéfalo para modular uma série de comportamentos sociais (DE VRIES & BUJIS, 1983; LANDGRAF, 1995; YOUNG, 1999). Estudos em roedores têm revelado a importância da OT, AVP e dos seus respectivos receptores desde a relação mãe-filho até comportamentos afiliativos e agonísticos entre indivíduos juvenis e adultos (BREDEWOLD et al., 2014; LIM & YOUNG, 2006; NEUMANN & LANDGRAF, 2012). Uma vez que a OT e a AVP modulam as emoções e as interações sociais, propõe-se que um desequilíbrio nesses neuropeptídeos possa contribuir para as disfunções sociais presentes em diversas psicopatologias, tais como depressão, ansiedade social e esquizofrenia (NEUMANN & LANDGRAF, 2012). Ademais, deficiências nos sistemas ocitocinérgico e vasopressinérgico têm sido correlacionadas com déficits sociais observados em transtornos particulares, tais como nos transtornos do espectro autista (LUKAS & NEUMANN, 2013; YRIGOLLEN et al., 2008). Além da participação nos comportamentos sociais, a OT e a AVP também estão envolvidas nas respostas ao estresse (ENGELMANN et al., 2004; JORGENSEN et al., 2002; NEUMANN et al., 2000).

### **1.1 Estresse e Respostas Hormonais**

Estresse é definido como uma ruptura na homeostase (ELENKOV & CHROUSOS, 2006; JOELS & BARAM, 2009). O animal, quando submetido a um ou mais eventos estressores, desencadeia uma série de mecanismos adaptativos que visam proteger o organismo e restaurar a homeostase, com mudanças tanto no sistema autonômico, quanto neuroendócrino (BOMHOLT *et al.*, 2004).

No estresse, o sistema autonômico simpático promove liberação de adrenalina pela medula adrenal e o sistema neuroendócrino promove liberação de glicocorticoides pelo córtex adrenal (McEWEN, 2002; TSIGOS & CHROUSOS, 2002). A ativação aguda desses sistemas é adaptativa, promovendo uma maior disponibilidade de energia e aporte sanguíneo aos órgãos-alvo (TSIGOS & CHROUSOS, 2002). Contudo, uma exposição prolongada aos glicocorticoides, causada pela ativação crônica desses sistemas, pode ter efeitos deletérios ao organismo (DALLMAN et al., 2004; MILLER & O'CALLAGHAN, 2002).

Uma resposta neuroendócrina típica ao estresse envolve, inicialmente, ativação do PVN, onde o hormônio liberador da corticotropina (CRH) é sintetizado. Os axônios dos neurônios PVN projetam-se para a zona externa da eminência média do hipotálamo, liberando este peptídeo no sistema porta-hipofisário – uma estrutura vascular especializada conectada à hipófise. A ativação do PVN promove a síntese e a liberação de diversos outros peptídeos derivados de um precursor comum: a pró-opiomelanocortina. Entre esses peptídeos está o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), o qual ativa a produção e liberação de glicocorticoides pelo córtex da adrenal (ELENKOV & CHROUSOS, 2006; HERMAN et al., 2012; PAPADIMITRIOU & PRIFTIS, 2009; SAPOLSKY et al., 2000).

Os hormônios glicocorticoides são os efetores finais do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), culminando com a liberação lenta e persistente de corticosterona (CORT) em ratos e de cortisol em humanos (HERMAN et al., 2012). Minutos após o início da exposição do animal ao estressor há um aumento dos níveis de glicocorticoides plasmáticos, atingindo seu pico entre 30 e 60 minutos (SAPOLSKY et al, 2000). Os glicocorticoides têm um papel regulador-chave no controle neuroendócrino do eixo HHA no término da resposta ao estresse, ao exercer retroalimentação negativa sobre receptores no hipotálamo, na hipófise e em estruturas do sistema límbico, como hipocampo e amígdala (HERMAN et al., 2012;

ELENKOV & CHROUSOS, 2006; JOELS & BARAM, 2009; CARRASCO & VAN DE KAR, 2003).

A OT também é considerada um hormônio do estresse, pois vários estressores que estimulam o eixo HHA promovem a secreção de OT, não apenas na circulação sanguínea, mas também no encéfalo de machos e fêmeas (NEUMANN et al., 2000). Contudo, a liberação de OT tem uma resposta específica do estressor – ou seja, responde a determinados estressores e não a outros (ENGELMANN et al., 2004; JORGENSEN et al., 2002). Em ratos, estímulos como contenção ou imobilização, estressores sociais, como derrota social e agressão, choque nas patas, nado forçado e medo condicionado, promovem liberação central e/ou periférica de OT (ENGELMANN et al., 2004; JEZOVÁ et al., 1995; ONAKA, 2004; ONAKA et al., 2012; SMITH & WANG, 2012). Estudos sugerem que a OT intracerebral pode estar envolvida no término das respostas ao estresse e/ou em processos adaptativos quando há uma exposição recorrente ao estressor (SMITH & WANG, 2012; ONAKA et al., 2012). O efeito inibitório da OT intracerebral pode ocorrer não apenas no PVN, mas também em regiões límbicas como hipocampo, amígdala e septo. Os achados de NEUMANN e colaboradores (2000), indicam que a OT inibe os neurônios do PVN que regulam a secreção de ACTH.

Outro neuropeptídeo que responde a estímulos estressores é a AVP. Juntamente com o CRH do PVN, a AVP potencializa a liberação de ACTH nas células corticotróficas da adeno-hipófise (PAPADIMITRIOU & PRIFTIS, 2009; SCOTT & DINAN, 1998). Similarmente à OT, a liberação da AVP depende do tipo de estressor (ENGELMANN et al., 2004; JORGENSEN et al., 2002; SCOTT & DINAN, 1998). Mudanças na osmolaridade plasmática, pressão sanguínea e volume sanguíneo elevam a concentração de AVP. Estressores envolvendo essas mudanças, tais como hemorragia ou privação de água, resultam em níveis aumentados de AVP (CARRASCO & VAN DE KAR; JEZOVÁ et al., 1995). Outros

estímulos estressores como hipoglicemia, choque nas patas, nado forçado e derrota social também são reconhecidos por induzirem aumentos na AVP central e/ou plasmática em roedores (ENGELMAN et al., 2004). Ademais, esse hormônio pode apresentar efeitos opostos aos da OT: enquanto a OT exerce efeitos ansiolíticos e antidepressivos, a AVP tende a causar ações ansiogênicas e depressivas (NEUMANN & LANDGRAF, 2012).

A prolactina (PRL), um hormônio polipeptídico, é principalmente sintetizada pelas células lactotróficas da adeno-hipófise. Esse hormônio apresenta funções diversas, como por exemplo: regulação do comportamento maternal (LARSEN & GRATTAN, 2012); participação na maturação do sistema neuroendócrino hipotalâmico em neonatos (BOLEFEYSOT et al., 1998); envolvimento nas respostas de estresse, trauma e ansiedade (PATIL et al., 2014). A PRL é aumentada na circulação sanguínea por estímulos estressores de contenção, estresse térmico, hemorragia e conflito social (CALDEIRA & FRANCI, 2000; FREEMAN et al., 2000). Após a exposição a estressores, o pico da concentração plasmática de PRL ocorre entre 2 a 5 minutos e o retorno às concentrações basais se dá aproximadamente após 15 minutos (SEVERINO et al., 2004; WAKABAYASHI et al., 1971). Do mesmo modo que a OT, a PRL também pode agir como um ansiolítico endógeno, capaz de induzir supressão da ansiedade de maneira dependente da dose (DONNER et al., 2007), bem como resposta a um estresse agudo (TORNER et al., 2001).

## **1.2 A Influência do Ambiente no Desenvolvimento de Neonatos**

Filhotes de roedores, durante as duas primeiras semanas pós-natal, mostram respostas neuroendócrinas diminuídas ao estresse. Essa fase é conhecida como o período hiporresponsivo ao estresse (LEVINE, 2001; VÁZQUEZ, 1998). Esse período tem por característica a redução da liberação do ACTH e de CORT em resposta à maioria dos

estressores, sensibilidade da adrenal ao ACTH reduzida, assim como mecanismo de retroalimentação negativa aos glicocorticoides exacerbado no hipotálamo e na hipófise (SUCHECKI et al., 1995; SILVEIRA et al., 2007). Este estágio neonatal de hiporresponsividade do eixo HHA poderia ser considerado um mecanismo adaptativo e protetor, uma vez que níveis elevados de corticosteroides durante este período crítico e anabólico do desenvolvimento têm efeitos profundamente deletérios e catabólicos que incluem a inibição do crescimento encefálico, da divisão celular dos neurônios, do desenvolvimento dos dendritos e do metabolismo neuronal (MEANEY et al., 1985). A presença materna também tem um papel importante na regulação das respostas ao estresse na prole, atenuando a ativação do eixo HHA (SUCHECKI et al., 1995). A interação mãe-filhote regula a retroalimentação da resposta ao estresse, assim como inibe as vias neurais responsáveis pela ativação da cascata neuroendócrina necessária para a liberação do ACTH (VAN OERS et al., 1998).

Apesar dos neonatos serem hiporresponsivos ao estresse, os filhotes podem apresentar respostas neuroendócrinas significativas a estressores nessa idade, tais como estresse por frio e separação maternal (HENRIQUES et al., 2014; KUHN et al., 1990; YI & BARAM, 1994). Interessantemente, a ontogenia das respostas neurais, endócrinas e comportamentais ao estresse e medo em filhotes é dependente da idade e do tipo de estressor (WALKER et al., 1991; WIEDENMAYER & BARR, 2001). Por exemplo, filhotes de ratos apresentam imobilidade, inibição de vocalizações ultrassônicas, secreção de ACTH aumentada e maior expressão de c-fos na amígdala quando expostos a um macho não-familiar a partir do 14º dia de vida, mas não antes dessa idade (TAKAHASHI, 1992a,b; WIEDENMAYER & BARR, 2001).

Contudo, as duas primeiras semanas de vida nos roedores são críticas para o desenvolvimento e experiências ambientais, como o cuidado maternal e estressores, podem

influenciar de maneira duradoura as respostas comportamentais e neuroendócrinas até a vida adulta do indivíduo (LEHMANN & FELDON, 2000; MEERLO et al., 1999; WALKER et al., 2004). Além disso, sabe-se que o cuidado parental tem um papel importante no desenvolvimento emocional e cognitivo da prole (KAFFMAN & MEANEY, 2007).

Ao considerar estudos os quais avaliam variações naturais na intensidade do comportamento maternal em diferentes ratas lactantes, animais adultos que receberam menor frequência de lambidas das mães apresentam aumento da ansiedade, prejuízos em comportamentos sociais e sexuais e nas respostas ao estresse (BRAKE et al., 2004; CAMERON et al., 2005; MENARD & HAKVOORT, 2007; STARR-PHILIPS & BEERY, 2014; URIARTE et al., 2007).

Em roedores, modelos experimentais de intervenção neonatal levam a efeitos duradouros na prole, os quais variam entre os diferentes protocolos. Por exemplo, animais adultos que foram submetidos à manipulação neonatal apresentam atenuação da ansiedade e das respostas neuroendócrinas ao estresse, prejuízo em comportamentos afiliativos e aumento da agressividade (MEERLO et al., 1999; PADOIN et al., 2001; TODESCHIN et al., 2009; SEVERINO et al., 2009). No entanto, ratos que sofreram separação maternal apresentam aumento da ansiedade e da reatividade ao estresse, assim como diminuição de comportamentos afiliativos (DE KLOET et al., 2005; DIEHL et al., em preparação; LAJUD et al., 2012).

Em humanos, adversidades ambientais no início do desenvolvimento estão associadas ao risco aumentado de desenvolver doenças físicas e transtornos psiquiátricos na vida adulta. Experiências de abuso infantil, negligência ou até mesmo de vínculo pobre com seus provedores, estão associados com maior risco de apresentar diabetes e doença cardiovascular (BATTEN et al., 2004; GOODWIN & STEIN, 2004), bem como aumento do risco de desenvolver ansiedade (PHILLIPS et al., 2005), depressão (BATTEN et al., 2004; HEIM et

al., 2008), esquizofrenia (READ et al., 2005; RUTTER et al., 2006), dependência e abuso de drogas psicotrópicas (DUBE et al., 2003; ANDA et al., 2006). Ao estudar crianças expostas a um ambiente socialmente aversivo, como no caso da violência doméstica, são relatados desenvolvimento de uma série de disfunções e transtornos, tais como: competência social diminuída, agressividade aumentada e comportamento antissocial (BEDI & GODDARD, 2007; CLEMENTS et al., 2008; EDLESON 1999; ERNST et al., 2008; FANTUZZO & FUSCO, 2007; HERRENKOHL et al., 2008; HUMPHREYS, 2007; SPILSBURY et al., 2008).

### **1.3 Comportamentos Sociais de Neonatos a Adultos**

As relações entre a ontogenia e a filogenia dos padrões comportamentais promoveram o interesse de mais estudos pela psicobiologia do desenvolvimento e pela genética comportamental. Questões específicas foram levantadas sobre a ligação entre os ajustamentos sociais de indivíduos durante a sua vida e modificações das espécies em evolução (BOWLBY, 1969; WILSON, 1975). Essas questões têm relevância em todos os aspectos do desenvolvimento social, desde as origens do vínculo entre mães e neonatos, até a plasticidade do comportamento agressivo. Diante de um desafio ambiental severo, adaptações naturais no ritmo do desenvolvimento de componentes neurais e comportamentais podem fornecer a base para novos padrões de adaptação social (CAIRNS, GARIÉPY, HOOD, 1990). Resultados empíricos são consistentes com a visão de que os comportamentos sociais estão entre as primeiras características a serem influenciadas pela experiência ambiental. As ações sociais têm propriedades distintas na adaptação porque elas organizam o espaço entre o organismo e o ambiente, promovendo novos ajustes rápidos e seletivos (CAIRNS, 1996).



O estudo experimental dos efeitos das interações sociais e eventos estressantes na vida têm contado principalmente com modelos em roedores (tipicamente envolvendo ratos e camundongos), embora alguns trabalhos em primatas forneçam suporte adicional aos efeitos profundos das experiências no início da vida (HARLOW et al., 1965; SUOMI et al., 1976). Os efeitos do estresse pré-natal, privação ou separação maternal, variações no cuidado maternal, enriquecimento ou isolamento social juvenil, assim como estresse social em adultos, têm sido explorados nesses modelos e sugerem que a qualidade das interações sociais ou a experiência do estresse podem induzir efeitos neuroendócrinos que influenciam o comportamento social, o sucesso reprodutivo, a habilidade cognitiva e as respostas ao estresse. Embora esteja claro que durante o desenvolvimento pré-natal e pós-natal precoce há um período de sensibilidade aumentada a esses efeitos ambientais, pode também haver plasticidade além da infância que se estende até a adolescência e a vida adulta (GUDSNUK & CHAMPAGNE, 2012).

### **1.3.1 Interações Mãe-Filhote**

Uma forte ligação da prole jovem com o provedor é crítica para a sobrevivência em espécies cujos filhotes nascem muito imaturos e dependentes, incluindo humanos e roedores (MCLEAN & HARLEY, 2004; MORICEAU & SULLIVAN, 2005). A relação mãe-filhote é tipicamente tida como simbiótica e recíproca, envolvendo a participação de ambos (ALBERTS & GUBERNICK, 1983; WALKER et al., 2004). Quando separados de suas mães, os filhotes de roedores sinalizam para a mãe recolhê-los através de estímulos olfativos, visuais e auditivos. Após a mãe recolher seus filhotes para o ninho, ela então os recobre com o corpo e os lambe (WILKINS et al., 1997). Em roedores, a manutenção do comportamento maternal

é dependente dos filhotes e é sincronizada pelo desenvolvimento pós-natal deles (MOGI et al., 2011).

Os estímulos dos filhotes influenciam os mecanismos responsáveis pelo comportamento materno. Além disso, o sistema neural envolvendo a OT tem um papel importante na formação do vínculo entre a mãe e seus filhotes. Entre esses estímulos, o contato físico tem um papel importante na manutenção do comportamento materno estimulando a liberação de OT (MOGI et al., 2011). Em roedores, o comportamento de amamentação que ocorre entre a mãe e seus filhotes recém-nascidos envolve a participação de ambos (WALKER et al., 2004). Durante a amamentação, mãe e filho liberam OT endógena, sendo sugerido que a OT e a PRL do leite materno, juntamente com outras moléculas bioativas, possam ter efeitos benéficos para o filho (CARTER, 2003; ELLIS et al., 1996). O ato de lambar da mãe é benéfico para ambos, mãe e filhote (GUBERNICK & ALBERTS, 1983; MEANEY 2001). Os filhotes são participantes ativos na interação da lambida, mas os machos são lambidos mais do que as fêmeas, talvez porque eles respondem mais rapidamente à estimulação materna do que as fêmeas, ou porque eles têm um odor diferente das fêmeas (MOORE & MORELLI, 1979; MOORE & CHADWICK-DIAS, 1986). Ademais, filhotes que recebem maior frequência de lambidas das mães apresentam maiores níveis plasmáticos de OT (HENRIQUES et al., 2014).

As interações do filhote com a mãe requerem circuitos de motivação e de aproximação social. Em roedores, os sistemas ocitocinérgico e opioidérgico motivam os filhotes para o contato social com sua mãe, possivelmente agindo em circuitos encefálicos de recompensa (CROMWELL, 2011; MOLES et al., 2004; NAGASAWA et al., 2012; NELSON & PANKSEPP, 1996, 1998; YOUNG et al., 1997). O sistema neural da OT em filhotes, regulado pela presença da mãe e por estímulos táteis, está relacionado ao vínculo nos filhotes (KOJIMA et al., 2012; KOJIMA & ALBERTS, 2011). Além do sistema ocitocinérgico, o

sistema neural da AVP também pode estar envolvido na formação de vínculo nos filhotes. Em ratos, observa-se que os filhotes, principalmente até o 10º dia pós-parto, apresentam uma circuitaria neural peculiar, adaptada a desenvolver um forte apego pela mãe, não importando a qualidade do cuidado maternal recebido (MORICEAU & SULLIVAN, 2005).

Conforme estudado em humanos, primatas e roedores, o prejuízo do vínculo mãe-filho influencia fortemente a sociabilidade da prole, apesar dos detalhes dos mecanismos subjacentes ainda não serem totalmente compreendidos (BOWLBY, 1958; HARLOW et al., 1965; MOGI et al., 2011). Por exemplo, a ansiedade patológica, a forma mais comum de transtorno de humor pós-parto (MATTHEY et al., 2003; WENZEL et al., 2003), afeta não somente a mãe, como também afeta a habilidade dos neonatos em estabelecer vínculo com a mãe, prejudicando substancialmente ambos (MANASSIS et al., 1994). Ademais, mães com ansiedade elevada acabam gerando uma prole também ansiosa (LARSEN & GRATTAN, 2012). Alguns autores propõem que os efeitos duradouros de intervenções experimentais no início da vida em roedores, tais como a manipulação neonatal e a separação maternal, sejam mediados pela alteração da relação mãe-filhote (DENENBERG, 1999; MACRÌ et al., 2008; PRYCE et al., 2001).

### **1.3.2 Formação de Vínculo em Neonatos**

Bebês recém-nascidos rapidamente aprendem o odor da mãe, a voz e o toque durante o período perinatal, desenvolvendo vínculo com a mãe (SULLIVAN & TOUBAS, 1998). Mamíferos altriciais como roedores nascem privados de visão e audição, permanecendo sem esses sentidos nas primeiras semanas pós-parto. Nos primeiros dias de vida, o reconhecimento da mãe pelo filhote ocorre pelo aprendizado olfatório (RAINEKI et al., 2010b). O olfato atua de maneira crítica na mediação da interação dos filhotes com a mãe, incluindo respostas de

aproximação, e organiza o comportamento social da prole. Além de ser atraente para os filhotes, o odor maternal também garante que eles receberão alimento, calor e cuidado. Então, o olfato é o sistema sensorial no início da ontogenia necessário para a sobrevivência nesses mamíferos recém-nascidos (MOGI et al., 2011). Os filhotes são atraídos por características quimiosensoriais do ventre da mãe e se fixam aos mamilos dela. A estimulação dos mamilos reforça o comportamento maternal, e o reconhecimento do odor específico da mãe pelos filhotes ocorre em combinação com as lambidas que eles recebem dela (SULLIVAN & WILSON, 2003). Nota-se dessa forma, que respostas comportamentais dos filhotes em relação à mãe determinam respostas comportamentais da mãe para com os seus filhotes e, quanto mais afiliativos forem os filhotes, mais cuidados receberão de suas mães. Esse vínculo inato garante o desenvolvimento físico do filhote e o subsequente desenvolvimento de comportamentos afiliativos adequados ao longo da vida do animal (NELSON & PANSKEPP, 1998).

A associação entre o cuidado maternal e o odor maternal para os filhotes depende da estimulação tátil que recebem da mãe, a qual induz a ativação do *locus ceruleus* (LC), um núcleo mesencefálico cujos axônios terminam no bulbo olfatório e liberam noradrenalina (NA). Até o dia pós-natal 10, ratos neonatos apresentam excitação prolongada do LC, o qual libera grandes quantidades de NA ao bulbo olfatório, comparado com o nível liberado depois do 10º dia. Logo, esse mecanismo faz com que o filhote desenvolva preferência pelo cheiro da mãe de maneira muito rápida (LEON 1998, SULLIVAN & WILSON, 2003). O aprendizado do vínculo em mamíferos pode ser considerado um processo maleável, uma vez que é repetidamente reforçado ao longo do período pós-natal, acompanhando possíveis modificações do odor maternal (RAINEKI et al., 2010b). Além disso, pesquisas em filhotes de ratos, cães, primatas e humanos demonstram que a prole geralmente exibe um forte vínculo mesmo com provedores abusivos (RAINEKI et al., 2010a; ROTH et al., 2013; ROTH &

SULLIVAN, 2005; SANCHEZ et al., 2001). Além da hiperatividade noradrenérgica do LC, a imaturidade da amígdala e do sistema HHA do neonato também contribuem para o aprendizado do odor da mãe (MORICEAU et al., 2009; MORICEAU & SULLIVAN, 2005).

No entanto, experimentos realizados em filhotes de roedores têm demonstrado que intervenções perinatais, assim como injeções de antagonistas de OT em neonatos, podem causar déficits na preferência por odores associados à mãe ou ao ninho (CROMWELL, 2011; DE SOUZA et al., 2012; KOJIMA & ALBERTS, 2011; NELSON & PANKSEPP, 1996; RAINEKI et al., 2009, 2013). Ademais, estudos de estresse pré-natal e manipulação neonatal encontraram efeitos também na neurobiologia subjacente da preferência olfatória, tais como alterações neuroquímicas no bulbo olfatório e no LC (DE SOUZA et al., 2012; RAINEKI et al., 2009).

### **1.3.3 Comportamento de Brincadeira em Juvenis**

Em mamíferos, o comportamento de brincadeira é a forma mais precoce de comportamento social que não é dirigido à mãe, mas aos seus pares (PELLIS & PELLIS, 1991; TREZZA et al., 2010). Similarmente às crianças humanas, a maioria dos mamíferos passa grande parte do tempo brincando com seus pares: correndo, perseguindo e lutando de brincadeira. A brincadeira social é caracterizada por formas exageradas de comportamento e por sua aparência vigorosa. Assim como na maioria dos mamíferos estudados, a ontogenia da brincadeira social em ratos segue uma curva em "U" invertido, sendo o pico no período juvenil – entre os 30 dias de vida – e decaindo com o decorrer da puberdade (PELLIS et al., 1997; PELLIS & PELLIS, 1990; PLETNIKOV et al., 1999). À medida que o animal amadurece, a estrutura da brincadeira social muda (PELLIS & PELLIS, 2009). Padrões de comportamentos afiliativos, sexuais e agressivos podem ser reconhecidos na brincadeira

social, embora os comportamentos juvenis e adultos difiram em intensidade, forma e contexto (PELLIS & PELLIS, 2009; VANDERSCHUREN et al., 1997). Outro aspecto da brincadeira é que este comportamento é sexualmente dimórfico, sendo que os juvenis machos apresentam maior frequência deste comportamento comparados às fêmeas (especialmente na brincadeira de luta) (COOKE & SHUKLA, 2011; MEANEY, 1988; PELLIS, 2002).

A forma mais comum de brincadeira em várias espécies de mamíferos e em algumas espécies de aves é brincar de luta ("*play-fighting*" ou "*rough-and-tumble play*") (PELLIS et al., 1996). Em ratos, uma sequência de brincar de luta começa com um animal solicitando brincar com outro, sendo que o parceiro pode aceitar ou não a solicitação. Além de saltitar ("*hop*" ou "*dart*"), o ataque (tradução livre de "*pouncing*") é o principal comportamento de solicitação de brincadeira, no qual o rato coloca as patas dianteiras no dorso do parceiro recipiente e esfrega o focinho na nuca dele (PELLIS & PELLIS, 1998; TREZZA et al., 2010; VANDERSCHUREN et al., 1997). Na sequência da brincadeira de luta, segue-se um movimento defensivo de supinação ("*pinning*"), no qual o parceiro recipiente realiza uma rotação no eixo longitudinal de seu corpo de forma que acabe em uma posição de supino e o atacante com as patas dianteiras sobre o ventre dele. A supinação é o comportamento de brincadeira mais característico (PELLIS & PELLIS, 2009; TREZZA et al., 2010), sendo considerado o ato consumatório da brincadeira de luta (PANKSEPP et al., 1984). A partir da solicitação (ataque), também podem se seguir outros comportamentos, tais como: boxear ("*boxing*"), consistindo nos animais ficarem em postura ereta, um batendo rapidamente com as patas dianteiras no outro; perseguição ("*chasing*"), que seria mover-se ou correr na direção do parceiro que se afasta para o sentido oposto; rotação parcial ("*partial rotation*"); limpeza social/agressiva ("*social/aggressive grooming*"); ou evasão ("*evasion*"). Outros comportamentos também observados durante a brincadeira são: passar por cima ou por baixo do parceiro ("*crawling over/under*") e cheirar o outro animal, que é o comportamento social

mais comum em ratos (BIELSKY & YOUNG, 2004; TREZZA et al., 2010; VANDERSCHUREN et al., 1997).

O comportamento de brincadeira é considerado benéfico, uma vez que ao variar, repetir e/ou recombinar subsequências de comportamento fora de seu contexto primário, brincar serve para desenvolver capacidades físicas, cognitivas e sociais, especialmente para adquirir flexibilidade para usar essas capacidades sob diferentes circunstâncias (HOMBERG et al., 2007; PELLIS & PELLIS, 2009; SPINKA et al., 2001). A brincadeira social é uma forma de comportamento altamente afiliativa sendo crucial para o desenvolvimento de respostas socioafetivas adequadas e para a aquisição de habilidades sociais (AUGER & OLESEN, 2009; VAN DEN BERG et al., 1999; VON FRIJTAG et al., 2002). Além dessas funções no desenvolvimento, a brincadeira social tem efeitos atenuadores do estresse e serve para manter a coesão do grupo (PELLIS & PELLIS, 2009). Outra característica marcante do comportamento de brincadeira é sua natureza altamente recompensadora para os juvenis, envolvendo sistemas de neurotransmissores intimamente implicados nos aspectos motivacionais, cognitivos e de prazer induzido por recompensas naturais ou por drogas (TREZZA et al., 2010).

Diversos sistemas neurotransmissores estão envolvidos no comportamento de brincadeira, tais como o sistema monoaminérgico, o canabinoide e o opioidérgico (HOMBERG et al., 2007; TREZZA et al., 2010; SIVIY & PANKSEPP, 2011; VANDERSCHUREN et al., 1997). A atividade dopaminérgica prosencefálica aumenta durante o comportamento de brincadeira (SIVIY & PANKSEPP, 2011). A neurotransmissão dopaminérgica é importante nas propriedades motivacionais de recompensa da brincadeira, enquanto os canabinoides e os opioides, dependendo do sítio de ação neural, mediam tanto aspectos hedônicos quanto motivacionais. Por exemplo, durante a brincadeira, opioides são liberados em estruturas encefálicas implicadas nos processos de recompensa, tais como o

núcleo *accumbens*, indicando assim a propriedade recompensadora (SIVIY & PANKSEPP, 2011; TREZZA et al., 2010; VANDERSCHUREN et al., 1995b). A atividade de outras estruturas encefálicas, tais como da amígdala medial, do septo lateral, do núcleo próprio da estria terminal e do córtex pré-frontal, também é importante no comportamento de brincadeira (COOKE & SHUKLA, 2011). O hipotálamo, por sua vez, participa na manutenção desse comportamento (VANDERSCHUREN et al., 1997). Quanto à OT e AVP, poucos trabalhos na literatura descrevem a relação desses neuropeptídeos com o comportamento de brincadeira (BREDEWOLD et al., 2014; CHENG & DELVILLE, 2009; VEENEMA et al., 2013; VEENEMA & NEUMANN, 2009). Foi relatado que a brincadeira estimula a atividade dos neurônios vasopressinérgicos hipotalâmicos em hamsters (CHENG et al., 2008) BREDEWOLD e colaboradores (2014) relataram a importância da OT e da AVP no septo lateral na regulação da brincadeira, podendo ser dependente do contexto e do sexo. Quanto à diferença sexual no comportamento de brincadeira (principalmente na brincadeira de luta), deve-se à exposição de hormônios gonadais – especialmente androgênios, como a testosterona – durante a vida perinatal (AUGER & OLESEN, 2009; COOKE & SHUKLA, 2011; MEANEY, 1988; PELLIS, 2002). Estruturas límbicas como a amígdala são consideradas críticas para esse aumento na frequência da brincadeira de luta em machos mediada por hormônio (PELLIS et al., 1997).

A habilidade de brincar é um dos principais indicadores de desenvolvimento saudável, tanto em animais quanto em humanos (TREZZA et al., 2010). Déficits no comportamento de brincadeira são sintomas presentes em transtornos neuropsiquiátricos na infância e na adolescência, tais como o autismo, o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, a esquizofrenia precoce e a depressão (ALESSANDRI, 1992; COOKE & SHUKLA, 2011; JORDAN, 2003; MOLLER & HUSBY, 2000; VANDERSCHUREN et al., 1997). O comportamento de brincadeira em roedores juvenis pode ser influenciado por variações



naturais do cuidado maternal ou por intervenções durante o período perinatal. Ratos que receberam menos lambidas das mães apresentam maior frequência de ataque, de supinação e de limpeza social agressiva quando juvenis comparados aos filhos de mães que lambem mais (PARENT et al., 2013; PARENT & MEANEY, 2008). O estresse pré-natal reduz o comportamento de brincadeira, ao passo que a separação maternal o aumenta (VEENEMA & NEUMANN, 2009; WARD & STEHM, 1991).

### **1.3.4 Interações Sociais em Adultos**

As interações sociais requerem dois ou mais indivíduos e que, neste contexto, os animais tenham o instinto e a motivação para permanecerem próximos. As interações sociais podem ser consideradas positivas, como as afiliativas (pró-sociais), quando ocorrem benefícios mútuos (CARTER & KEVERNE, 2002; INSEL & WINSLOW et al., 1998). A motivação para que os animais se mantenham em um mesmo ambiente baseia-se nas vantagens que esse comportamento traz, como por exemplo, a de garantir proteção, alimentação e reprodução, facilitando a sobrevivência. As interações sociais também podem ser negativas, como os comportamentos agressivos (CARTER & KEVERNE, 2002). O comportamento agressivo em machos é necessário para a aquisição e manutenção de recursos, tais como alimento, território e parceiras sexuais (NEUMANN et al., 2010). A agressão ofensiva adaptativa compreende principalmente comportamentos inofensivos de ameaça, permitindo ao oponente escapar ou demonstrar comportamentos submissos, de forma a evitar confronto físico direto. Enquanto a agressão ofensiva é geralmente expressa durante uma luta por território ou por parceiras sexuais, a agressão defensiva é observada principalmente em situações de risco de vida e está relacionada ao medo aumentado (BLANCHARD et al., 2003). Foi observado que as interações sociais são sensíveis a fatores ambientais, sendo

reduzidas em ambientes não-familiares (VARLINSKAYA & SPEAR, 2008). Além disso, a interação social em ratos é sexualmente dimórfica, sendo que as fêmeas apresentam uma redução dos comportamentos afiliativos e agressivos em comparação aos machos (CARRIER & KABBAJ, 2012; JOHNSTON & FILE, 1991; STACK et al., 2010).

Quando dois ratos adultos estão juntos, eles engajam-se em interações sociais, que incluem vários comportamentos, entre eles: cheirar o corpo e a região anogenital, montar, perseguir, rastejar sobre ou sob o parceiro; e algumas vezes apresentam comportamentos agressivos (agonísticos), tais como os ataques lateral e frontal, morder, chutar e boxear (FILE & HYDE, 1978; PATIN et al., 2005). Os comportamentos de cheirar e perseguir um novo indivíduo são considerados comportamentos de investigação social, podendo também ocorrer comportamentos de mordiscar e lambe (BIELSKY & YOUNG, 2004; KEPECS et al., 2005). Nos ratos, o sistema olfatório principal e o sistema olfatório acessório são ativados durante os encontros sociais. Cheirar e perseguir o outro animal presente no mesmo ambiente indica que não somente sinais olfatórios voláteis são utilizados para a discriminação, mas também sinais feromonais (FERGUSON et al., 2002). Em roedores, a piloereção, a ameaça e o ataque lateral (nos flancos) são sinais de agressão ofensiva, enquanto que o ataque frontal (em direção à cabeça) é considerado agressão defensiva (BLANCHARD et al., 2003).

Entre outras moléculas, a OT e a AVP têm papéis chave na regulação de uma ampla variedade de comportamentos sociais, incluindo os afiliativos, sexuais, agressivos e cognição social, tanto em ratos quanto em humanos (HEINRICHS & DOMES, 2008; NEUMANN & LANDGRAF, 2012; VEENEMA, 2012). Esses neuropeptídeos exercem seus efeitos ligando-se a receptores expressos em diversas estruturas encefálicas as quais desempenham funções relevantes no comportamento social (BARBERIS & TRIBOLLET, 1996; GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001).

Nesse contexto, uma das principais funções que a OT exerce é a de facilitar a motivação social e a aproximação (LIM & YOUNG, 2006). O trabalho de WITT e colaboradores (1992) relatou que a infusão crônica de OT diretamente no encéfalo aumenta o tempo de contato social entre ratos adultos. Similarmente, os comportamentos afiliativos de fêmeas de esquilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) são aumentados por injeções subcutâneas de OT (RAZZOLI et al., 2003). Estudos mostram que, durante as interações sociais percebidas como positivas, a OT é liberada (NEUMANN, 2008; UVNAS-MOBERG, 1998) e ocorre mudança na atividade opioide central (TREZZA et al., 2011; VANDERSCHUREN et al., 1995a). Além disso, a atividade coordenada da OT e da serotonina no núcleo *accumbens* está envolvida no aspecto recompensador das interações sociais (DÖLEN et al., 2013). A AVP regula diversos comportamentos sociais típicos de machos, incluindo a demarcação por cheiro, agressão e comportamento paternal (LIM & YOUNG, 2006). O circuito da AVP associado a comportamentos agressivos e territoriais em machos compreende neurônios vasopressinérgicos originados da amígdala medial e do núcleo próprio da estria terminal, assim como projeções para o septo lateral e regiões hipotalâmicas, especialmente o hipotálamo anterior (DE VRIES & BUJIS, 1983; FERRIS et al., 1997; GOBROGGE et al., 2007; KOOLHAAS et al., 1998). Por outro lado, a OT central desempenha atividade antiagressiva em machos (CALCAGNOLI et al., 2013, 2014). Estudos com arganazes (roedores do gênero *Microtus*) indicam que esses neuropeptídeos são importantes na formação de vínculo entre machos e fêmeas, sendo que a AVP tem um papel predominante em machos e a OT, em fêmeas (LIM & YOUNG, 2006). Ademais, tanto a OT quanto a AVP são importantes na formação ou expressão de memórias sociais, as quais são necessárias para a discriminação de indivíduos familiares (BIELSKY & YOUNG, 2004; FERGUSON et al., 2002).

Relações sociais saudáveis são essenciais para a saúde mental, por outro lado, diversos transtornos psiquiátricos são associados a prejuízos na motivação social e na habilidade em manter relações sociais (LIM & YOUNG, 2006). O entendimento de como o encéfalo processa informação social e como regula o comportamento social é crítico na compreensão das bases neurobiológicas de transtornos mentais afetando esse parâmetro. Nesse sentido, tem sido investigado o envolvimento da OT e da AVP em psicopatologias (BARTZ & HOLLANDER, 2006; COCHRAN et al., 2013; LUKAS & NEUMANN, 2013). Indivíduos com transtornos do espectro autista, esquizofrenia, depressão e transtorno de personalidade *borderline* apresentam alterações nos sistemas envolvendo OT e AVP (BERTSCH et al., 2013; GREEN et al., 2001; MERCEDES PEREZ-RODRIGUEZ et al., 2014; MODAL et al., 1998; RUBIN et al., 2014; SCANTAMBURLO et al., 2007).

Quanto à compreensão dos papéis desses neuropeptídeos em psicopatologias, pesquisas em animais também têm sido de grande valor. Ratos submetidos a estresse pré-natal, manipulação neonatal ou a menores frequências de lambidas das mães apresentam redução dos comportamentos afiliativos e aumento dos comportamentos agressivos na vida adulta (DE SOUZA et al., 2013; MENARD & HAKVOORT, 2007; STARR-PHILLIPS & BERRY, 2013; TODESCHIN et al., 2009; VEENEMA, 2012). Foi relatado que o estresse pré-natal e a manipulação neonatal também induzem redução de neurônios ocitocinérgicos no PVN, bem como alterações nos neurônios vasopressinérgicos nesse núcleo hipotalâmico (DE SOUZA et al., 2013; TODESCHIN et al., 2009). Similarmente, a exposição à separação maternal em ratos aumenta a agressividade e a expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) da AVP no PVN e no SON quando adultos (VEENEMA et al., 2006). Estudos com camundongos *knockout* para OT relatam uma série de alterações comportamentais nesses animais, tais como prejuízos nas interações sociais, na memória social e aumento da

agressividade em adultos (CRAWLEY et al., 2007; LAZZARI et al., 2013; WINSLOW & INSEL, 2002).

### **1.3.5 Comportamento Maternal**

Alterações fisiológicas importantes ocorrem durante o período gestacional e pós-parto em mamíferos, estimulando a mãe a cuidar da prole e garantir sua sobrevivência (GIOVENARDI et al, 2000; NEUMANN, 2003; WALKER et al, 2004). Já está estabelecido na literatura que as mudanças hormonais que ocorrem no parto intensificam os mecanismos responsáveis pelo comportamento maternal, envolvendo a ativação da área pré-óptica medial e dos sistemas neurais dopaminérgicos (NUMAN & STOLZENBERG, 2009). Outro sistema de destaque é o ocitocinérgico, pois a OT facilita a iniciação do cuidado maternal em ratos e ovelhas (INSEL & YOUNG, 2000). A OT originada do PVN ou do SON pode agir nos receptores de OT por todo o encéfalo para promover responsividade materna, fazendo com que a mãe cuide de sua prole. Em muitas espécies, a PRL tem uma participação essencial na regulação neural e hormonal do comportamento maternal – por exemplo, regulando a atividade de células ocitocinérgicas e reduzindo a ansiedade em lactantes (LARSEN & GRATTAN, 2012). A PRL é responsável pela produção de leite e também está criticamente envolvida na mediação das adaptações do SNC que ocorrem durante a gestação para sustentar a lactação. Outra mudança em mamíferos também observada em roedores é a resposta diminuída ao estresse nas lactantes (BRUNTON et al., 2008; HAHN-HOLBROOK et al., 2011; NEUMANN, 2003; SLATTERY & NEUMANN, 2008). Durante o período pós-parto, muitas dessas mudanças são estimuladas e mantidas pelos próprios filhotes, como pelo ato de sucção do leite materno ou pela vocalização.

O cuidado materno-filial, amplamente presente em mamíferos, pode ser estudado em roedores e avaliado por comportamentos como lambida ano-genital no filhote para estimulação da micção, construção do ninho, agrupamento dos filhotes no ninho e posicionamento sobre eles para provê-los de nutrição, calor e afago (CHAMPAGNE et al., 2003; KRISTAL, 2009). Entre esses diversos comportamentos maternos, o comportamento da mãe de lambar as crias é tido como um dos mais importantes – não apenas por sua grande contribuição para o desenvolvimento da prole, como também nos estudos das bases fisiológicas do comportamento maternal (LIU et al., 1997; MEANEY 2001; SMYTHE et al., 1994). Autores que estudaram variações naturais do comportamento maternal relataram que ratas lactantes, as quais têm frequências elevadas de comportamento de lambida, também apresentam maior frequência de outros tipos de cuidado maternal, como a presença no ninho e a amamentação com dorso arqueado (HENRIQUES et al., 2014; MEANEY et al., 2001). Além disso, essas ratas apresentam mais receptores de OT na área pré-óptica medial, no septo lateral, no núcleo central da amígdala, no PVN e no núcleo próprio da estria terminal (FRANCIS et al., 2000).

Contudo, intervenções perinatais, tais como a manipulação neonatal, a separação maternal e o estresse pré-natal, podem alterar o comportamento maternal (AGUGGIA et al., 2013; CIRULLI et al., 2003; MACRÍ et al., 2008; PRYCE et al., 2001). Por exemplo, a manipulação neonatal aumenta o comportamento de lambida das mães (DE AZEVEDO et al., 2010; LIU et al., 1997), ao passo que o estresse pré-natal em ratas prenhes levará à redução desse comportamento no período pós-parto (DE SOUZA et al., 2012). Tem sido relatado que estímulos socialmente aversivos também podem afetar o comportamento maternal (CARINI & NEPHEW, 2013; MURGATROYD & NEPHEW, 2013; VEIGA et al., 2011b; ZULUAGA et al., 2013). Dependendo da severidade da aversão social usada no protocolo experimental, o

comportamento de lambida pode ser aumentado (ZULUAGA et al., 2013) ou diminuído (CARINI et al., 2013; NEPHEW & BRIDGES, 2011).

A agressão maternal é um comportamento apresentado pelas mães durante a lactação com o objetivo de proteger os filhotes e defender seu território na presença de algum intruso (CONSIGLIO & BRIDGES, 2009; EBENSPERGER, 1998; FERREIRA et al., 2002; LONSTEIN, 2005; LONSTEIN & GAMMIE, 2002; NUMAN & INSEL, 2003; ROSENBLATT et al., 1994). De forma semelhante aos outros mamíferos, as mães humanas também podem apresentar agressividade acentuada durante o período da amamentação (HAHN-HOLBROOK et al., 2011; MAESTRIPIERI, 1992). Ratos machos adultos, não-familiares, podem apresentar comportamento infanticida em relação a ratos neonatos estranhos (EBENSPERGER, 1998; MENNELLA & MOLTZ, 1988; PAUL & KUPFERSCHMIDT, 1975; SIVIY & HARRISON, 2008). Ratas lactantes com filhotes atacam intensamente intrusos que invadem seu território, enquanto fêmeas não lactantes raramente demonstram comportamento agressivo (NUMAN, 1988; ROSENBLATT et al., 1988). Em ratos, o comportamento agressivo maternal ocorre com mais frequência do 3º ao 12º dia pós-parto (ERSKINE et al., 1978; CONSIGLIO & BRIDGES, 2009). Nessa situação, as fêmeas apresentam o comportamento de ataque frontal e cuidado maternal, além dos comportamentos também observados em machos, como investigação social, avançar, dominar, rodear, postura agressiva, ataque lateral e morder (LUCION & DE ALMEIDA, 1996). Os filhotes não precisam estar presentes durante o conflito agressivo para que as mães apresentem comportamento agressivo considerável (FLANELLY & KEMBLE, 1988), mas é necessário que as mães tenham sido recentemente expostas aos filhotes para manterem seus altos níveis de agressividade (LONSTEIN & GAMMIE, 2002). Em adição aos filhotes e aos intrusos, há outros estímulos sensoriais que podem também modular a agressividade em ratas mães. Importantes sistemas neurotransmissores como o GABAérgico, o serotonérgico e o

dopaminérgico (FERREIRA et al., 2000; CHAMPAGNE et al., 2004), bem como os neuropeptídios OT, AVP e PRL (BOSCH, 2013; FRANCIS et al., 2002; LARSEN & GRATTAN, 2012; LENG et al., 2008) estão envolvidos no controle neural da agressão maternal.

Em roedores, a agressão das fêmeas durante o período pós-parto representa uma adaptação típica da espécie e o aumento da agressividade além deste nível pode representar um modelo de agressão excessiva (VEIGA et al., 2007). Assim, fêmeas no período pós-parto podem ser utilizadas como um modelo de agressividade naturalmente aumentada, associada com a provocação social (VEIGA et al., 2007, 2011a, 2011b).

### **1.3.5.1 O Paradigma de Provocação Social**

O teste do intruso é um modelo amplamente usado para estudar o comportamento agressivo em roedores e consiste em submeter o animal experimental, residente, a um animal intruso (KOOLHAAS et al., 2013). A provocação social, ou instigação social, é um protocolo experimental utilizado para elevar os níveis de agressividade antes dos indivíduos serem expostos ao teste do intruso (VEIGA et al., 2007, 2011a, 2011b). O protocolo de provocação social aumenta apenas o repertório comportamental agressivo, não alterando comportamentos não-agressivos, como a locomoção (DE ALMEIDA & MICZEK, 2001). O aumento do comportamento agressivo é resultante da exposição do residente a um oponente, denominado provocador ou instigador, por um curto período de tempo, colocado atrás de um anteparo, antes do confronto com o intruso (POTEGAL, 1991). Em geral, hamsters, camundongos e ratos, quando confrontados com um intruso em suas caixas ou em um meio não-familiar, iniciam ataques com pequena latência e alta frequência após terem sido expostos previamente à presença de um provocador (CENTENARO et al., 2008; DE ALMEIDA & MICZEK, 2001;



FISH et al., 1999; POTE GAL, 1991). FISH e colaboradores (1999) demonstraram que a exposição de um camundongo residente a um camundongo provocador macho adulto aumenta a agressividade a um intruso. Todavia, outros estímulos como um camundongo juvenil ou uma fêmea não são suficientes para gerar altos níveis de agressividade. Ratos Wistar apresentam uma frequência basal de comportamento agressivo bastante reduzido, assim, submetê-los à provocação social é uma forma de aumentar seus níveis de agressividade contra um intruso, tornando o modelo mais sensível (VEIGA et al., 2011b).

O protocolo de exposição das lactantes ao macho provocador seguido de confronto com o macho intruso é designado “provocação social”. A provocação social, além de promover mudanças comportamentais como o aumento do comportamento agressivo contra o intruso, também produz mudanças fisiológicas e neuroquímicas como, por exemplo, a diminuição da concentração de serotonina no hipotálamo e córtex pré-frontal medial de roedores (PAYNE et al. 1984, VAN ERP & MICZEK, 2000). Ratas lactantes expostas ao paradigma de provocação social, na presença de seus filhotes, apresentam diminuição dos níveis plasmáticos de CORT e PRL, assim como atenuação do comportamento maternal durante a exposição (VEIGA et al., 2011a). A literatura apresenta os efeitos comportamentais e hormonais agudos da provocação social em mães, porém não há trabalhos relatando os efeitos persistentes desse procedimento no comportamento maternal, tampouco estudos sobre as consequências nos filhotes.

*Hipótese*

---

## 2. Hipótese

Ao levar em conta trabalhos anteriores com intervenções no ambiente neonatal, a hipótese deste trabalho é que o paradigma de provocação social na díade mãe-ninhada nos dias pós-parto 2 e 5 possa levar aos seguintes efeitos nas mães e na prole:

- Aumento do comportamento maternal;
- Redução do comportamento afiliativo em filhotes (aos 7 dias);
- Redução do comportamento de brincadeira em juvenis (aos 30 dias);
- Redução dos comportamentos sociais e da ansiedade, bem como atenuação das respostas hormonais ao estresse em adultos (a partir dos 80 dias);
- Alterações hormonais plasmáticas nas 3 idades, como diminuição dos níveis de hormônios envolvidos em comportamentos sociais – principalmente a ocitocina – bem como atenuação dos níveis de corticosterona em resposta a um estresse na vida adulta.

*Objetivos*

---

### 3. Objetivos

#### 3.1. Gerais

Avaliar o efeito do paradigma de provocação social, aplicado nos dias pós-natais 2 e 5, no comportamento maternal de ratas lactantes e o impacto deste nos comportamentos sociais e nas respostas hormonais de sua prole em diferentes idades (filhotes, juvenis e adultos), em ambos os sexos.

#### 3.2. Específicos

- Verificar se o paradigma de provocação social produz mudanças no comportamento maternal;
- Avaliar, em filhotes submetidos à provocação social no período neonatal, o comportamento de preferência olfatória aos 7 dias de idade, bem como as concentrações plasmáticas de corticosterona (CORT), ocitocina (OT), arginina-vasopressina (AVP) e prolactina (PRL);
- Avaliar, em juvenis submetidos à provocação social no período neonatal, o comportamento de brincadeira aos 30 dias de idade, bem como as concentrações plasmáticas de CORT, OT, AVP e PRL aos 31 dias de idade;
- Avaliar, em adultos submetidos à provocação social no período neonatal, os comportamentos de ansiedade, locomoção e interação social a partir de 80 dias de idade;
- Analisar, em adultos submetidos à provocação social no período neonatal, as concentrações plasmáticas de CORT, OT, AVP e PRL após estresse por contenção aos 90 dias de idade;

Para atingir esses objetivos, os resultados foram divididos em 3 seções. A 1ª seção descreve as alterações do comportamento maternal de ratas lactantes, bem como alterações hormonais e comportamentais de sua prole aos 7 dias, os quais foram submetidos à provocação social nos dias pós-parto 2 e 5. Segue-se a essa, a 2ª e a 3ª seções, as quais descrevem alterações hormonais e comportamentais de ratos juvenis (aos 30 e 31 dias) e de ratos adultos (a partir de 80 dias), respectivamente, os quais foram submetidos à provocação social no período neonatal.

## *Material e Métodos*

---

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Animais

Ratos Wistar, machos e fêmeas, utilizados neste trabalho eram provenientes do Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e foram alojados em biotério setorial do Departamento de Fisiologia da UFRGS.

Para cada um dos experimentos descritos em cada seção deste trabalho, foram utilizadas 20 ratas prenhes, mantidas isoladas em caixas de policarbonato (48 × 34 × 22 cm), com piso forrado de maravalha autoclavada, sob condições ideais de biotério, como temperatura ambiente de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , ciclo claro/escuro de 12 horas (5:00 – 17:00h) e água e ração *ad libitum* (Rodent Chow, Nutrilab, São Paulo, SP).

As ratas prenhes foram observadas diariamente para determinar a data do nascimento dos filhotes. No final do dia do parto, definido como dia pós-parto zero (PP0), as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes cada uma. As caixas das ratas lactantes com os filhotes não eram higienizadas de PP0 a PP10 para evitar manipulação dos animais, exceto no primeiro experimento (1ª seção), quando uma pequena porção da maravalha suja (~300 mL) foi recolhida em PP0 e armazenada em biofreezer ( $-80^\circ\text{C}$ ) para posterior avaliação do comportamento olfatório dos filhotes em PP7. O número estabelecido de 10 ratas prenhes por grupo experimental se justifica pela necessidade de pareamento do grupo exposto ao paradigma de provocação social com ratas não expostas, avaliando-se os efeitos da intervenção frente a um grupo controle. O número de animais por grupo foi definido de acordo com VEIGA e colaboradores (2007; 2011a,b).



No modelo da provocação social, repetido para cada experimento, foram utilizados 10 ratos machos adultos (provocadores), com cerca de 180 dias de idade, por experimento, além de 20 ratos machos juvenis (intrusos), com cerca de 35 dias de idade, por experimento. Esses animais também foram alojados no mesmo Biotério Setorial, mantidos em caixas brancas de polipropileno (41 × 34 × 16 cm), agrupados em 5 por caixa, sob as mesmas condições padrão de biotério já descritas. O número de ratos provocadores se justifica pelo número de ninhadas utilizadas em cada experimento. Embora a exposição tenha sido realizada em PP2 e PP5, estes estavam protegidos por um tubo de acrílico, não sofrendo agressão direta da rata lactante, conforme descrito abaixo. No entanto, o número de ratos intrusos foi o dobro, evitando-se que o mesmo rato fosse exposto com frequência à agressão das ratas lactantes em PP2 e PP5.

Nos experimentos com as mães e os filhotes, conforme descrito na 1ª seção, foram utilizados dois casais de filhotes, de cada uma das ninhadas: submetidas à provocação social (Intervenção) e não (Controle). Nos experimentos com os juvenis e os adultos, descritos na 2ª e 3ª seção, respectivamente, os animais foram separados de suas mães em PP21, após o desmame, e agrupados em 4 animais por caixa (polipropileno branca, 41 × 34 × 16 cm), de acordo com o sexo. Deste modo, em ambos experimentos, cada grupo experimental (machos Controle, machos Intervenção, fêmeas Controle e fêmeas Intervenção) tinha 10 caixas de ratos (total, 40 caixas, 160 animais).

Adicionalmente, para o teste de interação social, descrito na 3ª seção, foram utilizados mais 20 machos e 20 fêmeas, com 90 dias de idade, completando os pares dos machos e fêmeas Controle e Intervenção (expostos à provocação social no período pós-natal) e testados nesse modelo de ansiedade.

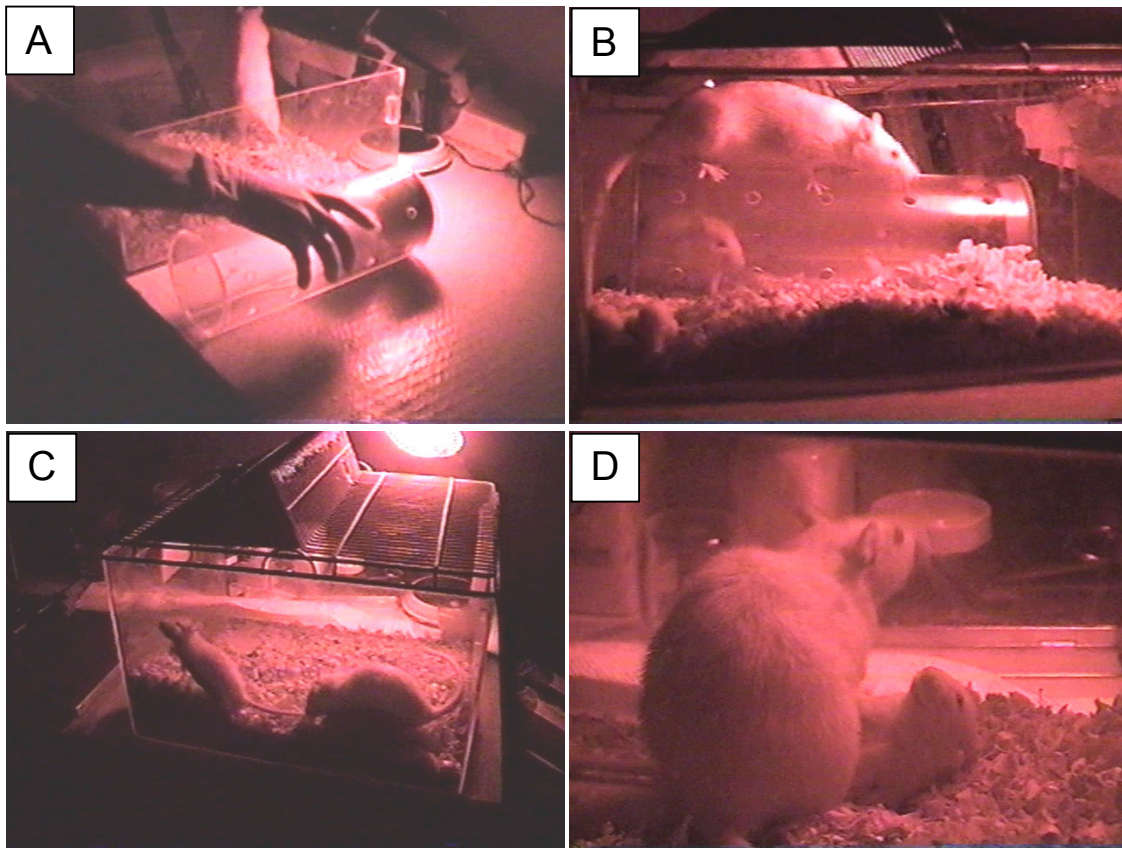
Portanto, para avaliação da ontogenia do comportamento social e das variações hormonais em ratos machos e fêmeas, foram utilizados na sua totalidade: 60 ratas prenhes; 480 filhotes (sendo que 1/3 foi estudado no período neonatal, 1/3 foi estudado quando juvenis

e outro 1/3 foi estudado na idade adulta); 30 ratos provocadores e 60 ratos intrusos; 40 ratos para o teste da interação social.

#### **4.2 Paradigma de provocação social em lactantes**

O paradigma de provocação social, realizado nas 3 seções deste trabalho, consiste na exposição sequencial da rata lactante, na presença da ninhada, a um rato macho provocador e a um rato macho intruso (VEIGA et al., 2007, 2011a,b). Inicialmente o rato provocador é colocado em um canto da caixa, protegido por um tubo de acrílico (28 cm × Ø 10 cm), por 5 min. Após a retirada do provocador, segue-se um intervalo de 5 minutos e, então o rato intruso juvenil é colocado em um dos cantos da caixa, desprotegido, por 10 min.

O paradigma de provocação social foi realizado nos dias PP2 e PP5, durante o ciclo escuro, na sala-moradia, a partir das 18 h, sob luz vermelha (18 w). Os animais do grupo Controle, cuja díade mãe-ninhada não foi exposta à provocação social, permaneceram na sala-moradia, sem serem perturbados. O procedimento experimental está ilustrado na Figura 1.



**Figura 1.** Paradigma de provocação social em lactantes (figura adaptada de VEIGA et al., 2011a). **(A)** Tubo com o macho provocador sendo introduzido na caixa da rata lactante residente (juntamente com seus filhotes). **(B)** Comportamento da lactante residente de investigação do tubo com o rato provocador. **(C)** Lactante residente cheirando o intruso. **(D)** Lactante apresentando comportamento agressivo de dominar o intruso.

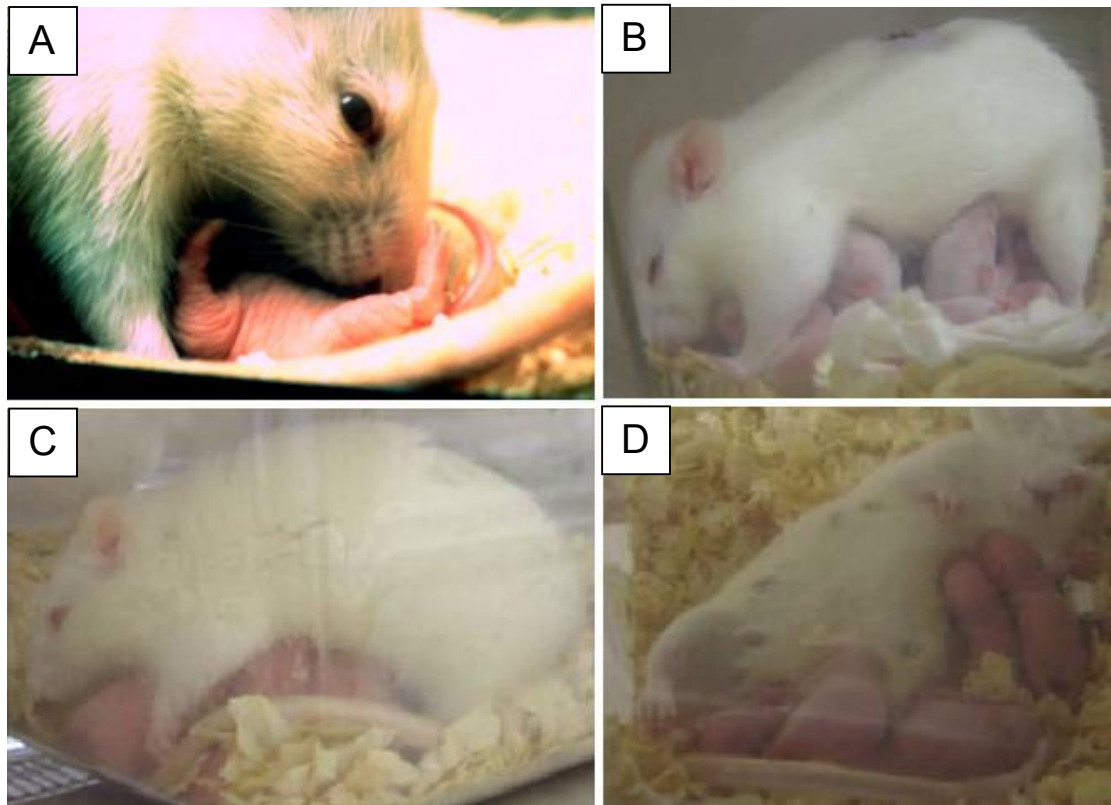
### **4.3 Análise dos Efeitos da Provocação Social sobre a Relação Mãe-Filhote e nas Respostas Hormonais em Filhotes**

#### **4.3.1 Registro do comportamento maternal**

O registro do comportamento maternal foi realizado similarmente a estudos anteriores (CHAMPAGNE et al., 2003; HENRIQUES et al., 2014; URIARTE et al., 2007). Nos dias PP3, PP4 e PP6, foi avaliado o efeito cumulativo da provocação social. As ratas foram observadas quanto ao comportamento maternal em 4 sessões diárias, sendo 3 durante a fase clara (9:30 h, 12:30 h e 15:30 h) e uma durante a fase escura (18:00 h). Cada sessão durava 72 min com registros pontuais a cada 3 min (25 observações por sessão), totalizando 100 observações ao longo do dia, para cada rata lactante. O mesmo protocolo foi empregado para avaliar o comportamento maternal de ratas lactantes não expostas ao paradigma da provocação social. Foram usadas planilhas para registrar os comportamentos observados (conforme no ANEXO I, Figura A).

Os comportamentos observados foram: mãe construindo o ninho, filhote fora do ninho, mãe carregando o filhote, mãe lambendo os filhotes (superfície do corpo e região anogenital), mãe amamentando em supino, mãe amamentando com dorso pouco arqueado, mãe amamentando com dorso bem arqueado, mãe amamentando com dorso bem arqueado e lambendo ao mesmo tempo, presença da mãe no ninho (independente do comportamento). Nessa avaliação, é possível o registro de mais de um comportamento ao mesmo tempo como, por exemplo, mãe amamentando em dorso pouco arqueado e lambendo. As frequências dos comportamentos de amamentação (em supino, em dorso pouco arqueado ou bem arqueado, em dorso bem arqueado e lambendo ao mesmo tempo) foram somadas para compor a medida de “amamentação total”. A soma das frequências dos comportamentos nos dias PP3, PP4 e PP6, foram tomadas como mediadas pela intervenção sobre o comportamento maternal e

comparadas à soma das frequências dos comportamentos maternos de ratas que não foram provocadas socialmente. Alguns comportamentos maternos estão ilustrados na Figura 2.



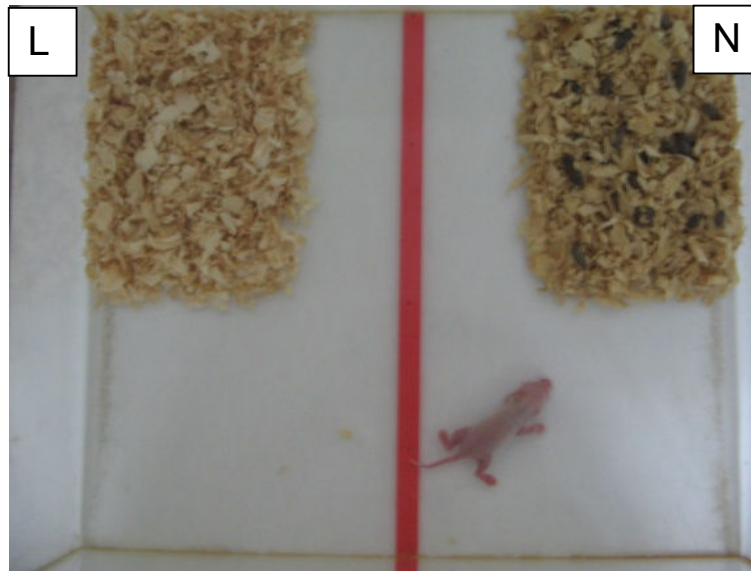
**Figura 2.** Exemplos de comportamentos maternos. **(A)** Comportamento de lamber os filhotes. **(B)** Amamentação com dorso muito arqueado. **(C)** Amamentação com dorso pouco arqueado. **(D)** Amamentação em supino.

#### 4.3.2 Teste de preferência olfatória em filhotes

Esse teste avalia a preferência do filhote pelo odor da mãe, impregnado na maravalha do ninho (DE SOUZA et al., 2012; RAINEKI et al., 2009, 2013). Foram usados para o teste filhotes em PP7, um macho e uma fêmea por ninhada. Para isso, 24 horas após o parto, ao final do dia denominado PP1, foi coletada parte da maravalha do ninho das ratas do grupo

Controle e do grupo Intervenção (submetido à provocação social). A maravalha coletada (cerca de 300 mL) foi acondicionada em sacos plásticos, bem vedados, identificados, e armazenada à -80°C em biofreezer até o dia do teste comportamental. O restante da maravalha permaneceu no ninho, sem ser trocada, para evitar estresse de manipulação. No dia PP7, os sacos com a maravalha foram retirados do freezer para atingir temperatura ambiente. Pouco antes do início do teste a maravalha era retirada do saco plástico e colocada em um dos cantos de uma arena de acrílico (24 × 34 × 40 cm), dividida lateralmente em duas áreas de 19 cm e uma área central de 1,5 cm denominada de zona neutra. Maravalha limpa, de mesmo volume (~300 mL) era colocada no canto oposto. O filhote era então colocado na área neutra, encostado na parede oposta às maravalhas, com a face voltada para elas. Após 1 min na caixa, o animal era retirado, a caixa era higienizada com álcool 30%, seca, e as maravalhas (do ninho e limpa) eram trocadas de posição. O mesmo animal retornava por mais 1 min e era novamente retirado para higienização e troca da posição das maravalhas, até completar 5 testes sequenciais. O teste está ilustrado na Figura 3.

Todos os comportamentos foram registrados por filmadora para posterior análise, com o auxílio do programa Noldus Observer (Noldus Information Technology, Holanda), o tempo total de permanência do filhote em cada área ao longo dos 5 minutos de observação, bem como o tempo em contato direto com o ninho. O teste de preferência olfatória ocorreu sempre em PP7, após as 14h, durante a fase clara.



**Figura 3.** Teste de preferência olfatória em filhotes, mostrando o lado com maravalha limpa (L) e o lado com maravalha do ninho (N).

#### 4.3.2.1 Coleta de sangue

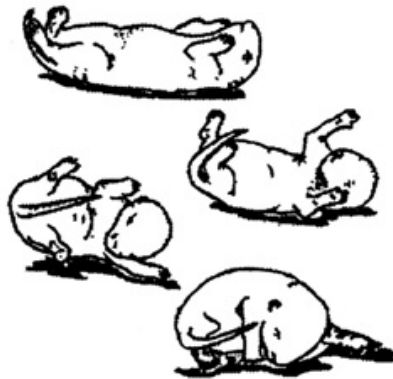
Imediatamente após o teste de preferência olfatória, os animais submetidos a esse experimento foram decapitados e o sangue troncular coletado para posterior análise hormonal.

#### 4.3.3 Avaliação motora e pesagem dos filhotes

Para descartar falsos negativo ou positivo no teste de preferência olfatória, no dia PP7 outro casal de filhotes (um macho e uma fêmea, irmãos dos animais submetidos ao teste de preferência olfatória) foi avaliado na sua atividade motora de acordo com STIGGER et al. (2013). Nesse protocolo, os animais foram analisados pelo: 1) teste de endireitamento – medido pela capacidade do filhote, em supino, voltar a posição de prono (Figura 4); 2) teste de geotaxis negativo – medido pela capacidade do filhote, posicionado em uma superfície

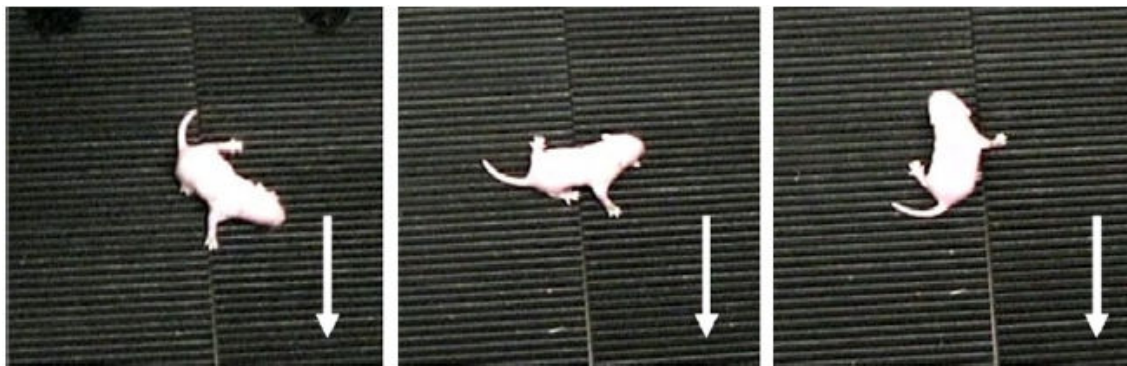
inclinada em 45°, de cabeça para baixo, virar-se e escalar (Figura 5); e 3) teste de campo aberto – medido pela capacidade do filhote de se locomover em um círculo de 13 cm de diâmetro dividido em quatro quadrantes, considerando resposta positiva quando o filhote sai do círculo, bem como latências para iniciar a locomoção e a quantidade de cruzamentos pelos quadrantes do círculo (Figura 6). A duração máxima para cada um dos testes foi de 1 minuto.

Também no dia PP7, logo antes dos experimentos comportamentais (teste de preferência olfatória e testes motores), ninhadas de 6 filhotes dos grupos Controle e Intervenção foram pesadas em balança de precisão. Os filhotes usados no teste de preferência olfatória (1 macho e 1 fêmea por ninhada) não foram pesados para não interferir na sensibilidade do teste.



**Figura 4.** Teste de endireitamento em filhotes, mostrando sequência de movimentos do neonato de mudar a posição de supino para prono (figura adaptada de RONCA & ABERTS, 2000).





**Figura 5.** Teste de geotaxis negativo em filhotes, mostrando seqüência de movimentos do neonato de mudar a posição em direção à subida da rampa (figura adaptada de EL-KHODOR et al., 2008).



**Figura 6.** Teste de campo aberto em filhotes.

#### **4.4 Análise dos Efeitos da Provocação Social sobre Parâmetros Comportamentais e Hormonais na Prole Juvenil**

##### **4.4.1 Registro da abertura ocular em neonatos, desmame e sexagem da prole**

O dia de abertura ocular em filhotes é tido como um índice de desenvolvimento do SNC (ELLENBROEK et al., 2005; URIARTE et al., 2007). A abertura ocular dos filhotes foi verificada durante as duas primeiras semanas pós-parto. A verificação ocorreu duas vezes por dia, pela manhã e no final da tarde. Foi registrado em uma planilha o dia no qual no mínimo um filhote de uma ninhada abria os olhos.

No dia do desmame, PP21, os animais foram confirmados quanto ao gênero e alojados em caixas de policarbonato transparentes (40 × 34 × 24 cm), 4 animais por caixa, com água e alimento a vontade. Portanto, cada colônia gerava um par de caixas, uma com 4 machos e outra com 4 fêmeas.

##### **4.4.2 Registro do comportamento de brincadeira**

O comportamento de brincadeira foi avaliado em juvenis de forma semelhante a estudos anteriores (KARKOW et al., 2013), sem retirar os animais de seus ambientes de moradia. Embora semelhante ao registro de comportamento maternal, o registro de comportamento de brincadeira foi realizado apenas no dia PP30, distribuído em 4 sessões, sendo uma no ciclo claro (14:00h) e 3 no ciclo escuro (17:00, 19:00h e 20:30h). Cada sessão durava 72 min, com registros de comportamentos realizados a cada 3 min, totalizando 25 observações por sessão e 100 observações por caixa. O comportamento de brincadeira,

registrado em planilha (ANEXO I, Figura B), foi considerado como o somatório dos comportamentos realizados pelos 4 animais da mesma caixa.

Foram avaliadas as frequências dos comportamentos de ataque, supinação, boxear, saltitar, perseguir e cheirar. Nessa avaliação, é possível o registro de mais de um comportamento ao mesmo tempo, como por exemplo: enquanto um dos juvenis da caixa está realizando o comportamento de ataque, outro está cheirando um terceiro animal. Alguns exemplos de comportamento de brincadeira (de luta) estão ilustrados na Figura 7. Após o término das sessões do dia, cada tipo de comportamento registrado foi somado para obter as suas frequências.



**Figura 7.** Comportamento de brincadeira em juvenis – as posturas mais características (adaptado de TREZZA et al., 2010): **(A)** ataque (“*pouncing*”) e **(B)** supinação (“*pinning*”).

#### 4.4.3 Coleta de sangue

No dia PP31, a partir das 18h, quando o animal estava ativo e demonstrando comportamentos de brincadeira, um filhote de cada colônia, de ambos os sexos, foi separado e decapitado para coleta de sangue para posterior análise hormonal.

## **4.5 Análise dos Efeitos da Provocação Social sobre Parâmetros Comportamentais e Hormonais na Prole Adulta**

Cada rato, macho e fêmea, foi submetido a um único experimento comportamental, a saber, campo aberto, labirinto em cruz elevado e teste de interação social. Ao final, parte desses animais submetidos ao campo aberto ou ao labirinto em cruz elevado foi aleatoriamente submetido ou não à contenção para análise das respostas hormonais ao estresse.

### **4.5.1 Teste do campo aberto**

Ratos machos e fêmeas foram testados no dia PP80, no campo aberto. O aparato do campo aberto consiste de uma caixa de madeira de 1 m<sup>2</sup> com paredes de 50 cm de altura, com sua base dividida em quadrantes de 20 cm<sup>2</sup>, perfazendo um total de 25 quadrados, sendo 16 periféricos (próximos às paredes) e 9 centrais. Nesse aparato, o animal é colocado em um dos cantos, com a face voltada para a parede e seus comportamentos são registrados por filmadora por um período de 5 min. Neste teste, são observados os comportamentos de cruzamentos nos quadrantes, tempo nos quadrantes centrais, bem como respostas de orientação (*rearing*) e comportamento de autolimpeza (*grooming*). Entre as exposições, o aparato é higienizado com álcool 70% e bem seco para a realização do próximo registro, evitando-se que os odores do animal anterior interfiram sobre o comportamento do seguinte. O teste de campo aberto iniciava após as 14h. Os comportamentos foram analisados com o auxílio do programa Noldus Observer (Noldus Information Technology, Holanda).

#### **4.5.2 Teste do labirinto em cruz elevado**

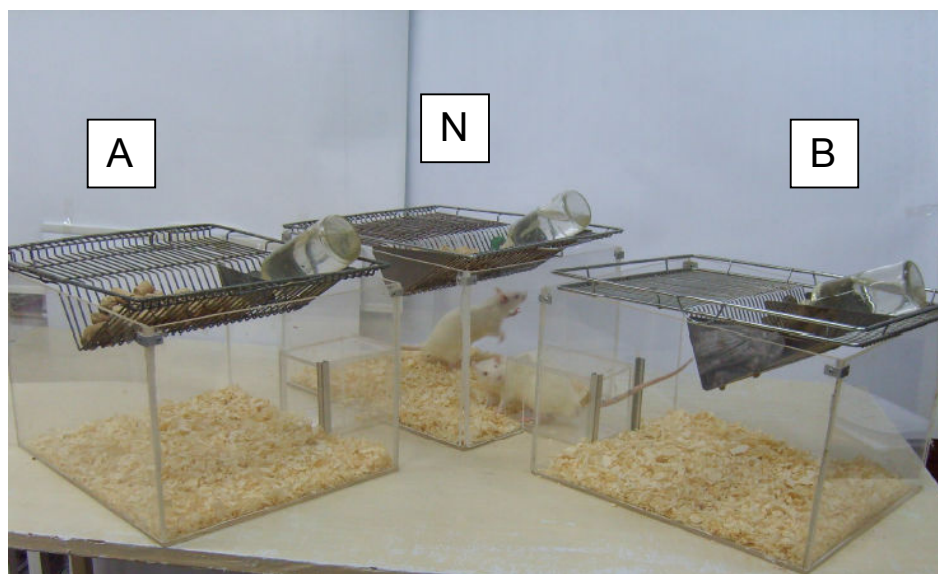
Os animais foram expostos ao teste do labirinto em cruz elevado em PP83. O teste consiste em colocar o animal no centro de um labirinto em formato de cruz, onde dois braços possuem as laterais fechadas, não permitindo que o animal tenha contato visual com o exterior. Os outros dois braços da cruz possuem as laterais abertas permitindo ao animal uma visão para o exterior, bem como a possibilidade de colocar a cabeça para o lado de fora do braço, dando-lhe a noção da altura (70 cm). O teste baseia-se no fato de que animais mais ansiosos permanecem mais tempo nos braços fechados, onde se sentem mais protegidos, explorando menos os braços abertos. Os comportamentos avaliados foram: tempo de permanência nos braços aberto e fechado, frequência de entradas nos braços aberto e fechado. Subsequentemente, foi calculada a percentagem de entradas nos braços abertos e fechados em relação ao número total de entradas e a percentagem do tempo gasto nos braços abertos e fechados em relação ao tempo total.

Todos os comportamentos foram registrados por filmadora, por 5 min e analisados com auxílio do programa Noldus Observer (Noldus Information Technology, Holanda). O experimento também ocorreu após as 14 h e entre um animal e outro, o aparato era higienizado e seco.

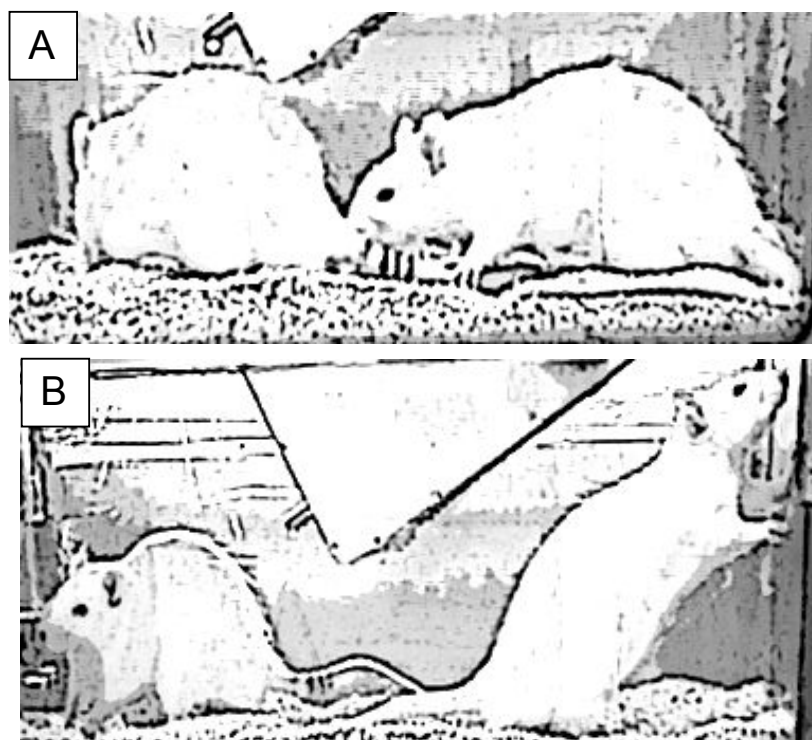
#### **4.5.3 Teste de interação social**

No dia PP86, os ratos foram isolados para o teste de interação social. Foi testado 1 rato por caixa (Controle ou Intervenção, machos ou fêmeas), não exposto aos testes comportamentais anteriores. O aparato de interação social consiste de 3 caixas de acrílico (40 × 45 × 40 cm), sendo os animais isolados nas caixas A e B, providas de portas e conectadas a

uma caixa neutra (N) através de corredores (Figura 8). Cada animal foi colocado na caixa A e pareado com outro animal (aleatório) de mesmo sexo e idade, colocado na caixa B. O teste iniciou 24h após o isolamento (PP87), sendo os animais ambientados por um período de 15 min na sala de experimentos, confinado em suas caixas (A ou B) com as portas fechadas. Após esse período, as portas foram abertas, permitindo livre acesso às 3 caixas (A, B e N) e os comportamentos foram avaliados por 15 min. Registrou-se a latência, frequência e duração dos seguintes comportamentos: cheirar, montar, comportamento agressivo (ataques frontal e lateral, mordida e boxear), presença no mesmo território sem demonstrar comportamentos sociais e animais em caixas diferentes (territórios diferentes). Exemplos de comportamentos observados estão ilustrados na Figura 9. Apenas os comportamentos dos animais experimentais, colocados inicialmente na caixa A, foram considerados para análise. Entre um animal experimental e outro, as caixas eram higienizadas e secas. O teste ocorreu no ciclo escuro, após as 18h, sendo a sala de experimentação iluminada com luz vermelha para permitir a filmagem dos comportamentos. Os vídeos foram analisados com auxílio do programa Noldus Observer (Noldus Information Technology, Holanda). Os procedimentos deste teste foram realizados de forma semelhante ao descrito anteriormente (DE SOUZA et al., 2013; DIEHL et al., em preparação; TODESCHIN et al., 2009), com a exceção de que, nesses trabalhos, os animais foram pareados com indivíduos dos mesmos grupos experimentais.



**Figura 8.** Teste de interação social em adultos, mostrando a caixa neutra (N) conectada às caixas A e B por corredores.



**Figura 9.** Exemplos de comportamentos registrados durante o teste de interação social (adaptado de MOURA & XAVIER, 2010). (A) Investigação social (cheirar). (B) Comportamentos não-sociais.

#### **4.5.4 Estresse por contenção**

O protocolo de estresse por contenção foi realizado em PP90, usando-se aleatoriamente os ratos que foram submetidos ao teste de campo aberto ou ao teste de labirinto em cruz elevado. Cada animal foi colocado individualmente em tubos transparentes e ventilados (24 × 9 × 5 cm), os quais impedem a movimentação, porém permitem que os movimentos respiratórios ocorram normalmente. Em todos os casos, os animais foram removidos de suas caixas-moradia e colocados em tubos de contenção em uma sala adjacente. O tempo de duração do estresse foi de 30 min, a partir das 14h. Os animais não submetidos ao estresse (os "íntactos") permaneceram em suas caixas-moradia sem serem perturbados.

##### **4.5.4.1 Coleta de sangue**

Os animais submetidos ao estresse de contenção por 30 min (grupo estresse) ou não (grupo íntacto), pertencentes aos grupos Intervenção e Controle, foram decapitados imediatamente após a contenção para coleta de sangue para posteriores análises hormonais.

#### **4.6 Análises hormonais**

Ao final de cada experimento, os animais foram mortos por decapitação e o sangue troncular foi coletado e centrifugado a 12.100 G, a 4°C, por 10 min. O plasma foi então armazenado em microtubos e mantido a -80°C para posterior análise dos níveis hormonais. Kits comerciais para CORT, OT, AVP (kits da Enzo Life Sciences) e PRL (kits da SPI Bio) foram usados para dosagens pelo método de ELISA, de acordo com as instruções do fabricante.



*Aspectos Éticos*

---

## 5. Aspectos Éticos

Todos os procedimentos realizados neste trabalho obedeceram as normas propostas pelos Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences – CIOMS; Goldim e Raymundo, 1997*), *Guidelines for Animal Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health* e a Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com parecer de nº 21397 (ANEXO II).

*Análise Estatística*

---

## 6. Análise estatística

Para os resultados que apresentavam distribuição normal (teste de Shapiro-Wilks), foram utilizados testes paramétricos como o teste t de Student ou análise de variância (ANOVA) de duas vias ou de três vias. Os dados que apresentaram distribuição normal foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.).

Dados que não apresentaram distribuição normal foram avaliados por testes não paramétricos, como o Kruskal-Wallis ou o teste de Qui-quadrado seguido pelo teste de Fisher. Resultados não-paramétricos foram expressos como mediana e desvio interquartilico (entre colchetes) e os gráficos no formato *boxplot*.

Para a realização das análises foi utilizado o software SPSS versão 18. Para todas as comparações, utilizamos um nível de significância  $P < 0,05$ .

*Resultados*

---

## **7. Resultados**

### **7.1 Efeitos da Provocação Social sobre a Relação Mãe-Filhote e nas Respostas Hormonais em Filhotes**

Esta seção apresenta resultados relacionados às alterações de comportamento maternal em ratas lactantes provocadas socialmente em PP2 e PP5, bem como as consequências dessa intervenção sobre parâmetros comportamentais e hormonais em filhotes no 7º dia pós-natal. Os resultados apresentados nesta seção foram reunidos em artigo científico submetido à revista *Developmental Psychobiology* (Fator de impacto: 3,163, ANEXO III).

#### **7.1.1 Frequências cumulativas de comportamentos maternos**

A análise estatística pelo teste-t de Student mostrou que as lactantes submetidas à provocação social (Intervenção) apresentaram maior frequência de presença no ninho ( $t = 2,211$ ;  $df = 19$ ;  $P = 0,04$ ) (Tabela 1). Não foram encontradas diferenças significativas entre ratas Controles e provocadas socialmente para os comportamentos de lambar, amamentação com dorso bem arqueado, amamentação com dorso bem arqueado e lambendo ao mesmo tempo, amamentação em supino; amamentação com dorso pouco arqueado, amamentação total, construção de ninho e filhote fora do ninho (Tabela 1). A baixa frequência do recolhimento dos filhotes para o ninho inviabilizou a análise estatística desse comportamento.

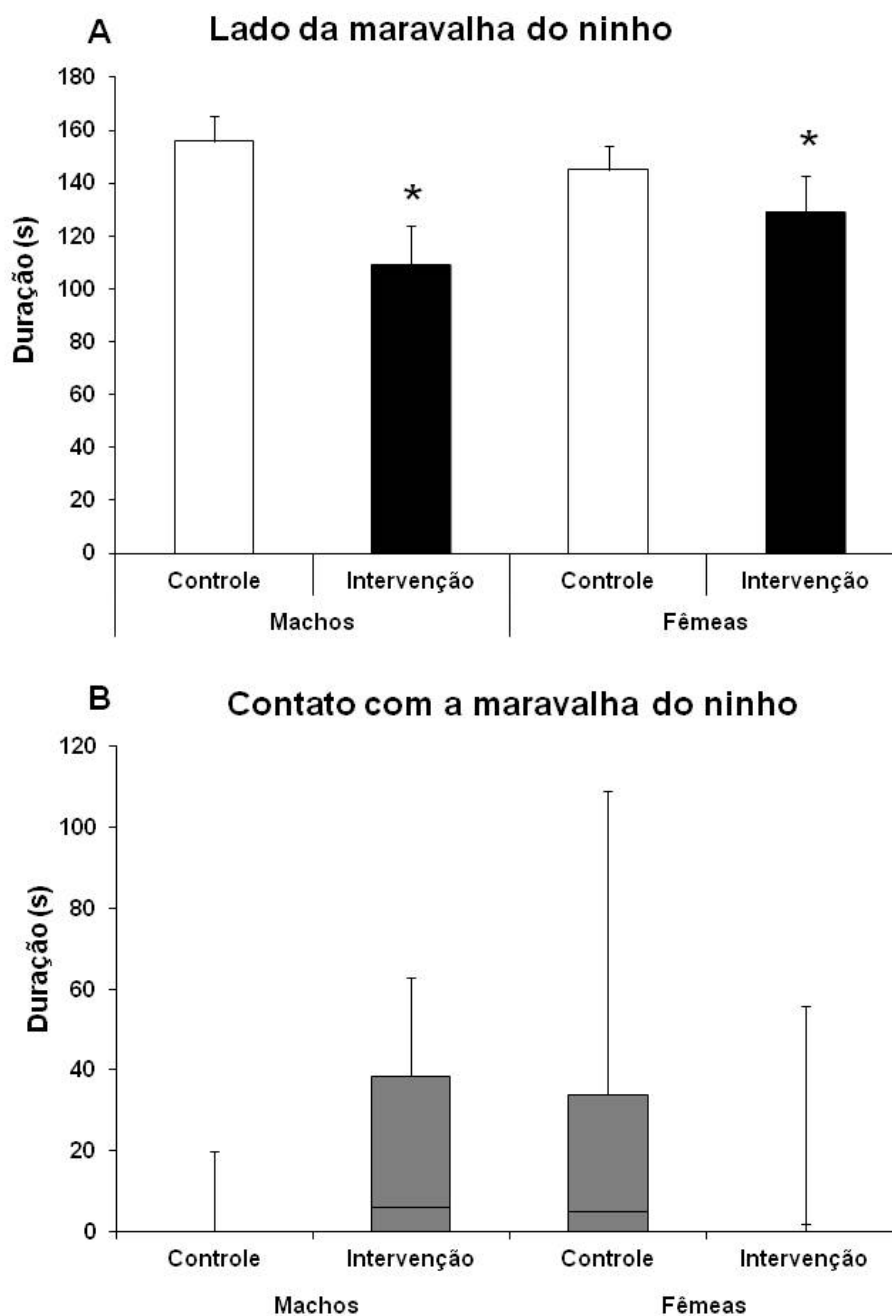
**Tabela 1.** Frequências cumulativas de comportamentos maternos (PP3, PP4 e PP6) de ratas lactantes Controles ou submetidas à provocação social. n = 10/grupo.

Comportamento	Controle	Intervenção	<i>P</i>
maternal			
Presença no ninho	175,00 ± 15,51	214,00 ± 7,07*	0,04
Lamber	7,27 ± 1,45	9,00 ± 1,24	0,38
Amamentação com dorso arqueado	97,27 ± 11,41	112,10 ± 9,72	0,34
Amamentação com dorso bem arqueado e lamber	6,55 ± 0,58	5,40 ± 0,91	0,29
Amamentação com dorso pouco arqueado	29,73 ± 4,42	39,00 ± 7,09	0,27
Amamentação em supino	1,82 ± 0,90	4,80 ± 1,59	0,13
Amamentação total	135,36 ± 14,68	161,30 ± 8,42	0,15
Construção de ninho	16,82 ± 3,59	13,20 ± 2,42	0,42
Filhote fora do ninho	9,00 ± 1,84	12,30 ± 3,58	0,43

Resultados expressos como média ± erro padrão. \* Diferente do grupo Controle, teste-t de Student.

### 7.1.2 Teste de preferência olfatória em filhotes

Para o comportamento olfatório dos filhotes em PP7, a ANOVA de duas vias revelou que os filhotes expostos à provocação social em PP2 e PP5 apresentam menor tempo de permanência no lado da maravalha do seu ninho (coletado no dia PP1) do que os filhotes Controle [( $F_{(1,39)} = 6,78$ ;  $P = 0,01$ ; Figura 10A)]. Ao analisar o tempo gasto em contato físico com a maravalha do ninho (Figura 10B), o teste de Kruskal-Wallis indicou que não houve diferença significativa, apesar do *P* ter sido marginal para redução na duração desse parâmetro no grupo Intervenção comparado ao Controle ( $P = 0,058$ ). Não foram encontradas diferenças entre os sexos.

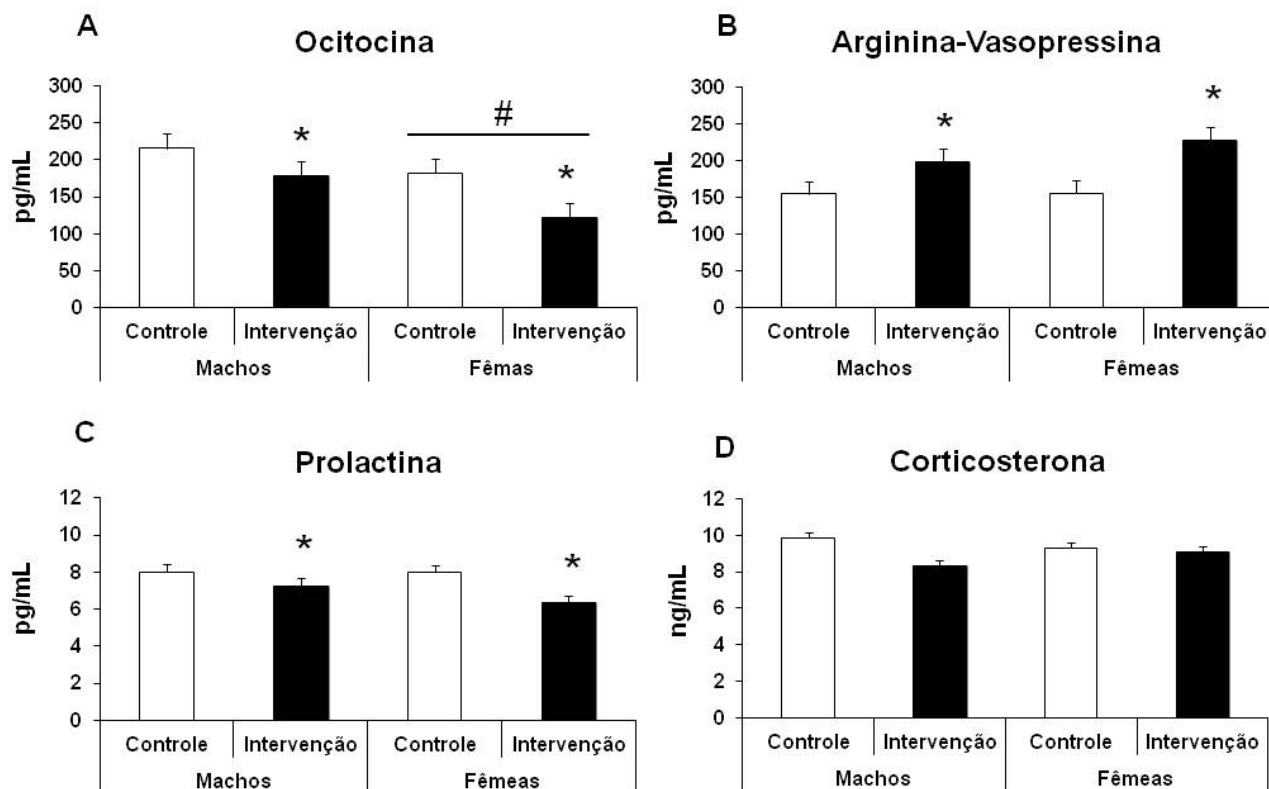


**Figura 10.** Teste de preferência olfatória em filhotes (PP7). O grupo Intervenção refere-se àqueles filhotes expostos à provocação social em PP2 e PP5. **(A)** Tempo gasto no lado da maravalha do ninho, ANOVA de duas vias,  $n = 10/\text{grupo}$ . \* Diferente do grupo Controle ( $P = 0,01$ ). **(B)** Tempo gasto em contato direto com a maravalha do ninho, Kruskal-Wallis,  $n = 10/\text{grupo}$  ( $P = 0,058$ ).



### 7.1.2.1 Respostas hormonais em filhotes após o teste de preferência olfatória

A ANOVA de duas vias mostrou que o hormônio OT está diminuído nos filhotes expostos à provocação social em PP2 e PP5 (Intervenção) comparados aos filhotes Controle ( $F_{(1,19)} = 5,38$ ;  $P = 0,03$ ). Além disso, para esse parâmetro, as fêmeas apresentam redução significativa comparadas aos machos ( $F_{(1,19)} = 4,51$ ;  $P = 0,05$ ; Figura 11A). Também foi observado aumento significativo na AVP nos filhotes do grupo Intervenção comparados aos Controles ( $F_{(1,18)} = 4,30$ ;  $P = 0,05$ ; Figura 11B). Para a PRL, a análise estatística mostrou redução significativa nos filhotes Intervenção ( $F_{(1,16)} = 5,83$ ;  $P = 0,03$ ; Figura 11C). Quanto à CORT plasmática, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Figura 11D).



**Figura 11.** Hormônios plasmáticos em filhotes (PP7). **(A)** Ocitocina (OT); **(B)** arginina-vasopressina (AVP); **(C)** prolactina (PRL); e **(D)** corticosterona (CORT), em Controle ou em expostos à provocação social em PP2 e PP5 (Intervenção). ANOVA de duas vias,  $n = 5-7/\text{grupo}$ . \* Diferente do grupo Controle ( $P < 0,05$ ); # diferente dos machos ( $P = 0,05$ ).

### 7.1.3 Testes motores e peso em filhotes

Não houve diferença significativa nos testes motores (respostas positivas, latências e número de cruzamentos no campo aberto, endireitamento e de geotaxis negativo) entre os dois grupos estudados de filhotes no dia PP7 (Tabelas 2, 3 e 4).

**Tabela 2.** Teste motor no campo aberto em filhotes (PP7) machos e fêmeas, Controles ou expostos à provocação social em PP2 e PP5 (Intervenção). Testes de Qui-quadrado e Fisher foram usados para comparar os grupos quanto às respostas positivas; teste de Kruskal-Wallis foi usado na análise das latências; ANOVA de duas vias foi usada na análise do número de cruzamentos. n = 10/grupo.

	Machos		Fêmeas		<i>P</i>
	Controle	Intervenção	Controle	Intervenção	
Respostas positivas	16,70%	33,30%	25,00%	50,00%	0,42
Latência (s)	60 [0]	60 [16]	60 [0]	60 [11]	0,35
Número de cruzamentos	7.82 ± 1,81	6,36 ± 0,93	5.25 ± 1,04	7.42 ± 0,93	0,77

Resultados expressos em percentagem, em mediana [desvio interquartilico] ou em média ± erro padrão.

**Tabela 3.** Teste motor de endireitamento (latência) em filhotes (PP7) machos e fêmeas, Controles ou expostos à provocação social em PP2 e PP5 (Intervenção). As respostas positivas do teste não foram representadas pois 100% dos filhotes apresentaram respostas positivas. ANOVA de duas vias foi realizada na comparação dos grupos. n = 10/grupo.

	Machos		Fêmeas		<i>P</i>
	Controle	Intervenção	Controle	Intervenção	
Latência (s)	2,33 ± 1,25	1,67 ± 0,51	1,08 ± 0,08	1,83 ± 0,47	0,95

Resultados expressos em média ± erro padrão.

**Tabela 4.** Teste motor de geotaxis negativo (respostas positivas e latências) em filhotes (PP7) machos e fêmeas, Controles ou expostos à provocação social em PP2 e PP5 (Intervenção). Testes de Qui-quadrado e Fisher foram usados para comparar os grupos quanto às respostas positivas; ANOVA de duas vias foi usada na análise das latências. n = 10/grupo.

	Machos		Fêmeas		<i>P</i>
	Controle	Intervenção	Controle	Intervenção	
Respostas positivas	41,70%	25,00%	50,00%	33,00%	0,75
Latência (s)	16,80 ± 1,68	23,33 ± 3,38	24,33 ± 3,05	28,25 ± 8,17	0,27

Resultados expressos em percentagem ou em média ± erro padrão.

Quanto ao peso das ninhadas, não houve diferença significativa entre o grupo de filhotes expostos à provocação social (Intervenção) frente aos filhotes Controles (Tabela 5).

**Tabela 5.** Pesagem das ninhadas (PP7) Controles ou expostas à provocação social em PP2 e PP5 (Intervenção). Teste-t de Student foi realizado para comparar os grupos. n = 8/grupo.

	Controle	Intervenção	<i>P</i>
Peso da ninhada (g)	124,20 ± 3,99	116,60 ± 2,94	0,15

Resultados expressos em média ± erro padrão.

## **7.2 Efeitos da Provocação Social sobre Parâmetros Comportamentais e Hormonais na Prole Juvenil**

Esta seção apresenta resultados relacionados às alterações comportamentais e hormonais em ratos juvenis expostos à provocação social em PP2 e PP5. Os resultados apresentados nesta seção serão reunidos e discutidos para posterior envio de artigo a ser publicado em revista científica.

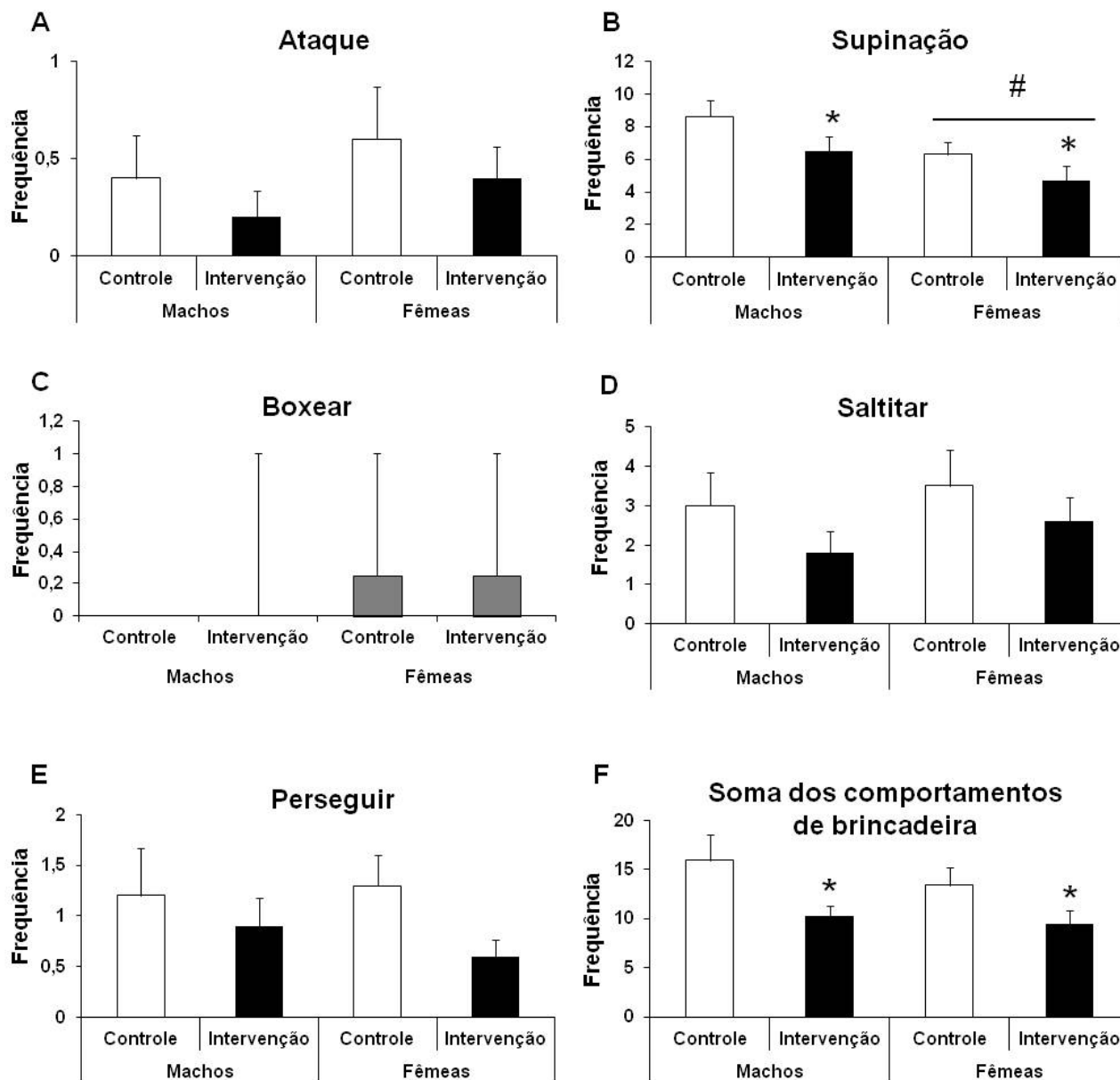
### **7.2.1 Abertura ocular em neonatos**

A análise pelo teste-t de Student não indicou diferença significativa para a latência de abertura ocular entre ninhadas dos grupos Controle e Intervenção (Controle:  $12,70 \pm 0,30$  e Intervenção:  $13,60 \pm 0,34$  dias;  $P = 0,06$ ).

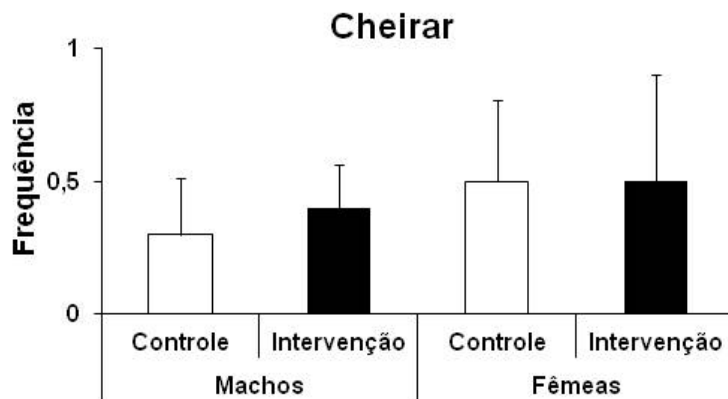
### **7.2.2 Comportamento de brincadeira em juvenis**

A ANOVA de duas vias mostrou que ratos juvenis (PP30), os quais foram expostos à provocação social em PP2 e PP5 (grupo Intervenção), não apresentaram diferenças significativas no comportamento de ataque (Figura 12A). No entanto, os animais Intervenção apresentaram menor frequência de supinação comparados aos Controles [ $F_{(1,36)} = 4,54$ ;  $P = 0,04$ ] (Figura 12B). Adicionalmente, para esse parâmetro, fêmeas apresentaram menor frequência de supinação comparadas aos machos [ $F_{(1,36)} = 5,58$ ;  $P = 0,02$ ]. O teste de Kruskal-Wallis indicou que não houve diferença na frequência de boxear (Figura 12C). A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças nos comportamentos de saltitar (Figura 12D) e perseguir (Figura 12E). A soma dos comportamentos de brincadeira mostrou que os ratos juvenis

pertencentes ao grupo Intervenção apresentam menor frequência de brincadeiras comparados aos juvenis Controles [ $F_{(1,36)} = 6,93$ ;  $P = 0,01$ ; Figura 12F]. Além dos comportamentos de brincadeira, não houve diferença para o comportamento social de cheirar (Figura 13).



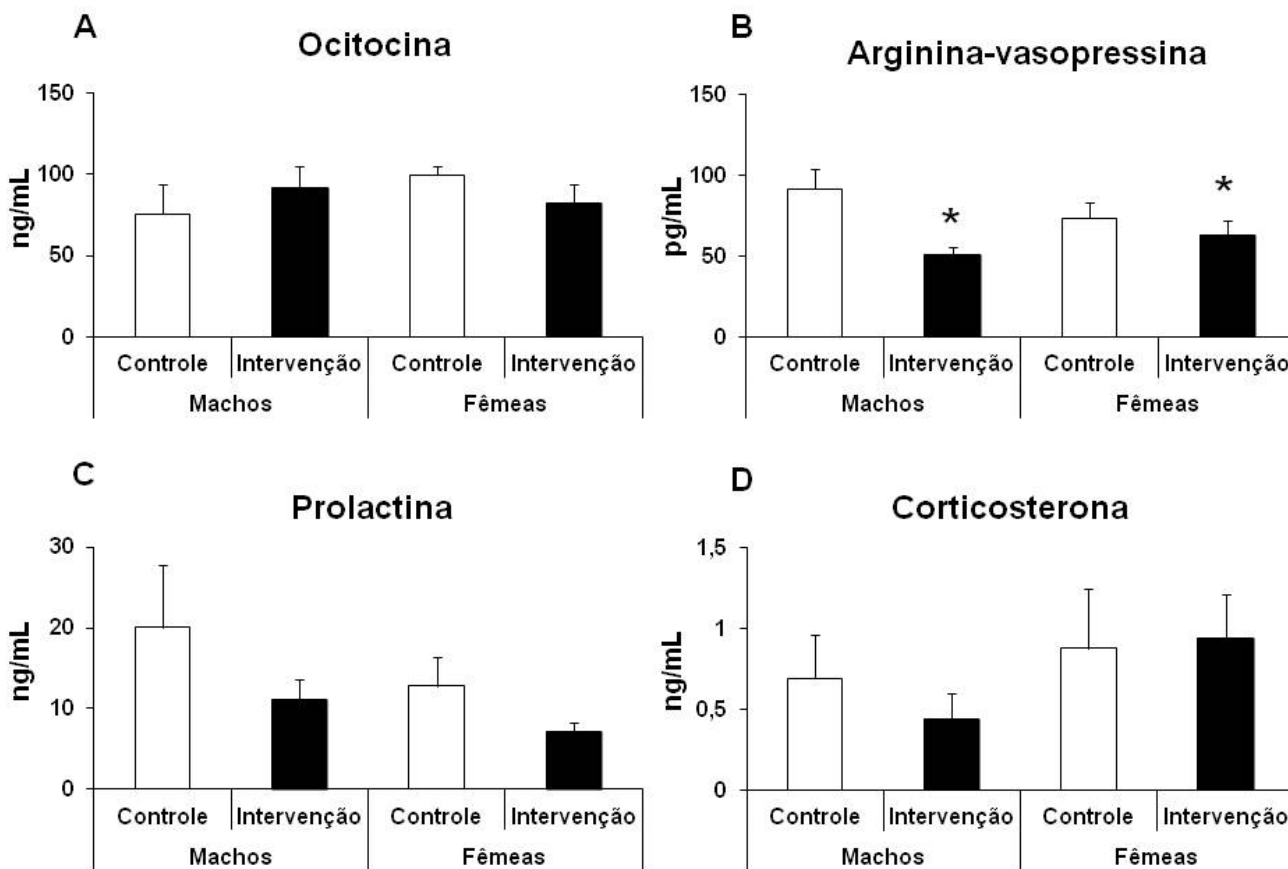
**Figura 12.** Comportamentos de brincadeira em juvenis (PP30). O grupo Intervenção refere-se àqueles animais expostos à provocação social em PP2 e PP5. Os diferentes comportamentos estão indicados de (A) a (F),  $n = 10$ /grupo. \* Diferente do grupo Controle ( $P < 0,05$ ); # diferente dos machos ( $P = 0,02$ ).



**Figura 13.** Comportamento social de cheirar em juvenis (PP30). O grupo Intervenção refere-se àqueles animais expostos à provocação social em PP2 e PP5. ANOVA de duas vias,  $n = 10/\text{grupo}$ .

### 7.2.3 Respostas hormonais plasmáticas em juvenis

A ANOVA de duas vias não mostrou diferença significativa na OT (Figura 14A), PRL (Figura 14C) ou CORT (Figura 14D) plasmática em juvenis. No entanto, foi observado redução da concentração plasmática de AVP nos ratos Intervenção comparados aos Controles (Figura 14B) [ $F_{(1,16)} = 7,46$ ;  $P = 0,01$ ].



**Figura 14.** Hormônios plasmáticos em juvenis (PP31). **(A)** Ocitocina (OT); **(B)** arginina-vasopressina (AVP); **(C)** prolactina (PRL); e **(D)** corticosterona (CORT) em ratos Controle ou expostos à provocação social em PP2 e PP5 (Intervenção). ANOVA de duas vias,  $n = 4-5$ /grupo. \* Diferente do grupo Controle ( $P = 0,01$ ).



### **7.3 Efeitos da Provocação Social sobre Parâmetros Comportamentais e Hormonais na Prole Adulta**

Esta seção apresenta resultados relacionados às alterações comportamentais e hormonais em ratos adultos expostos à provocação social em PP2 e PP5. Os resultados apresentados nesta seção serão reunidos e discutidos para posterior envio de artigo a ser publicado em revista científica.

#### **7.3.1 Teste do campo aberto**

A ANOVA de duas vias não revelou diferença significativa entre ratos adultos (PP80) expostos à provocação social em PP2 e PP5 (grupo Intervenção) ou não (grupo Controle) no período pós-natal para os parâmetros de: número de cruzamentos, tempo central total, tempo total de *grooming*, frequência de *rearing* e número de bolos fecais no teste do campo aberto (Tabela 6).

**Tabela 6.** Teste campo aberto em ratos adultos (PP80) machos e fêmeas, Controles ou expostos à provocação social em PP2 e PP5 (Intervenção). ANOVA de duas vias, n=10/grupo.

		Machos		Fêmeas		<i>P</i>
		Controle	Intervenção	Controle	Intervenção	
Número total	de cruzamentos	87,60 ± 10,90	101,20 ± 13,89	114,80 ± 11,85	121,00 ± 10,58	0,41
Tempo central	total (s)	8,60 ± 2,59	11,00 ± 3,92	7,10 ± 2,29	8,30 ± 2,44	0,54
Tempo total de	<i>grooming</i> (s)	15,40 ± 3,18	13,10 ± 3,86	23,90 ± 7,82	16,40 ± 4,18	0,34
Frequência de	<i>rearing</i>	2,90 ± 0,62	5,50 ± 2,61	3,80 ± 2,00	6,20 ± 2,06	0,21
Número de	bolos fecais	4,60 ± 0,93	4,10 ± 0,75	3,40 ± 0,82	4,80 ± 0,74	0,58

Resultados expressos em média ± erro padrão.

### 7.3.2 Teste de labirinto em cruz elevado

A análise dos comportamentos no teste de labirinto em cruz elevado não mostrou diferença significativa no percentual de entrada nos braços abertos ou nos braços fechados entre o grupo Intervenção (expostos à provocação social em PP2 e PP5) e o grupo Controle (Tabela 7). No entanto, as fêmeas apresentaram maior percentual de entrada nos braços abertos e menor percentual de entrada nos braços fechados, quando comparadas aos machos, independentemente do grupo ao qual pertenciam [ $F_{(1,36)} = 4,52$ ;  $P = 0,04$ ].

Quanto às percentagens de tempo nos braços abertos e fechados, não foram encontradas quaisquer diferenças significativas. Quanto aos bolos fecais, também não foram encontradas diferenças significativas.

**Tabela 7.** Teste do labirinto em cruz elevado em ratos adultos (PP83) machos e fêmeas, pertencentes aos grupos Controle ou Intervenção (expostos à provocação social em PP2 e PP5). n = 10/grupo.

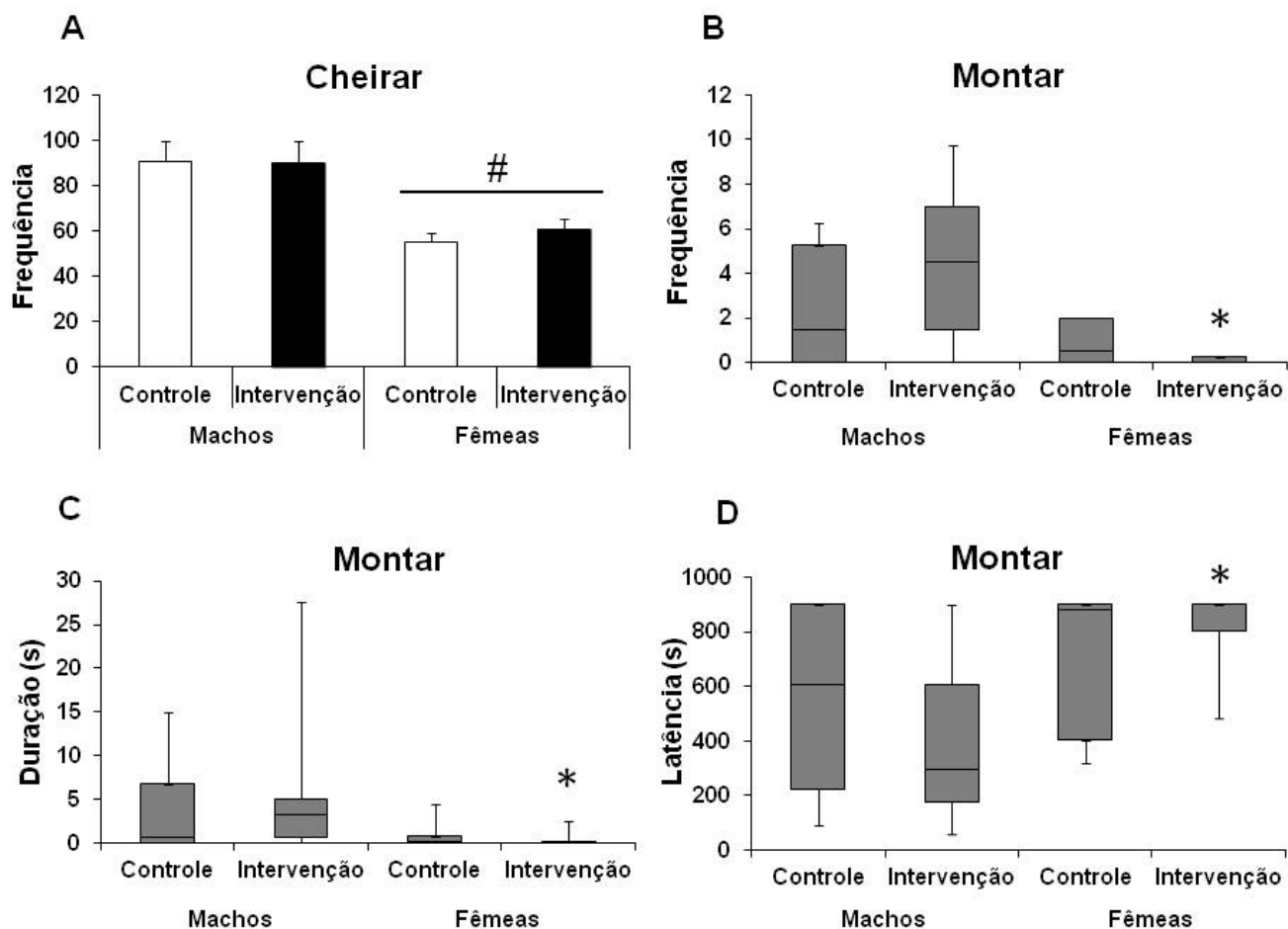
	Machos		Fêmeas		<i>P</i>
	Controle	Intervenção	Controle	Intervenção	
% Entradas nos braços abertos	39,72 ± 4,68	38,44 ± 4,09	49,71 ± 1,69 <sup>#</sup>	43,97 ± 3,44 <sup>#</sup>	0,04
% Entradas nos braços fechados	60,28 ± 4,68	61,56 ± 4,09	50,29 ± 1,69 <sup>#</sup>	56,03 ± 3,44 <sup>#</sup>	0,04
% Tempo nos braços abertos	14,14 ± 4,65	9,46 ± 2,35	12,95 ± 4,98	11,43 ± 3,64	0,42
% Tempo nos braços fechados	85,59 ± 0,22	90,54 ± 2,35	87,04 ± 9,98	88,57 ± 3,64	0,43
Número de bolos fecais	1,50 ± 0,64	2,60 ± 0,69	1,70 ± 0,91	0,80 ± 0,39	0,88

Resultados expressos em média ± erro padrão. ANOVA de duas vias. # Diferente dos machos.

### 7.3.3 Teste de interação social

Os resultados do teste de interação social foram agrupados da seguinte maneira: interações não-agressivas (Figura 15), interações agressivas (Figura 16) e comportamentos não-sociais (Figura 17). Parâmetros nos quais não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (quanto às frequências, durações e latências de cada comportamento), não foram representados graficamente.

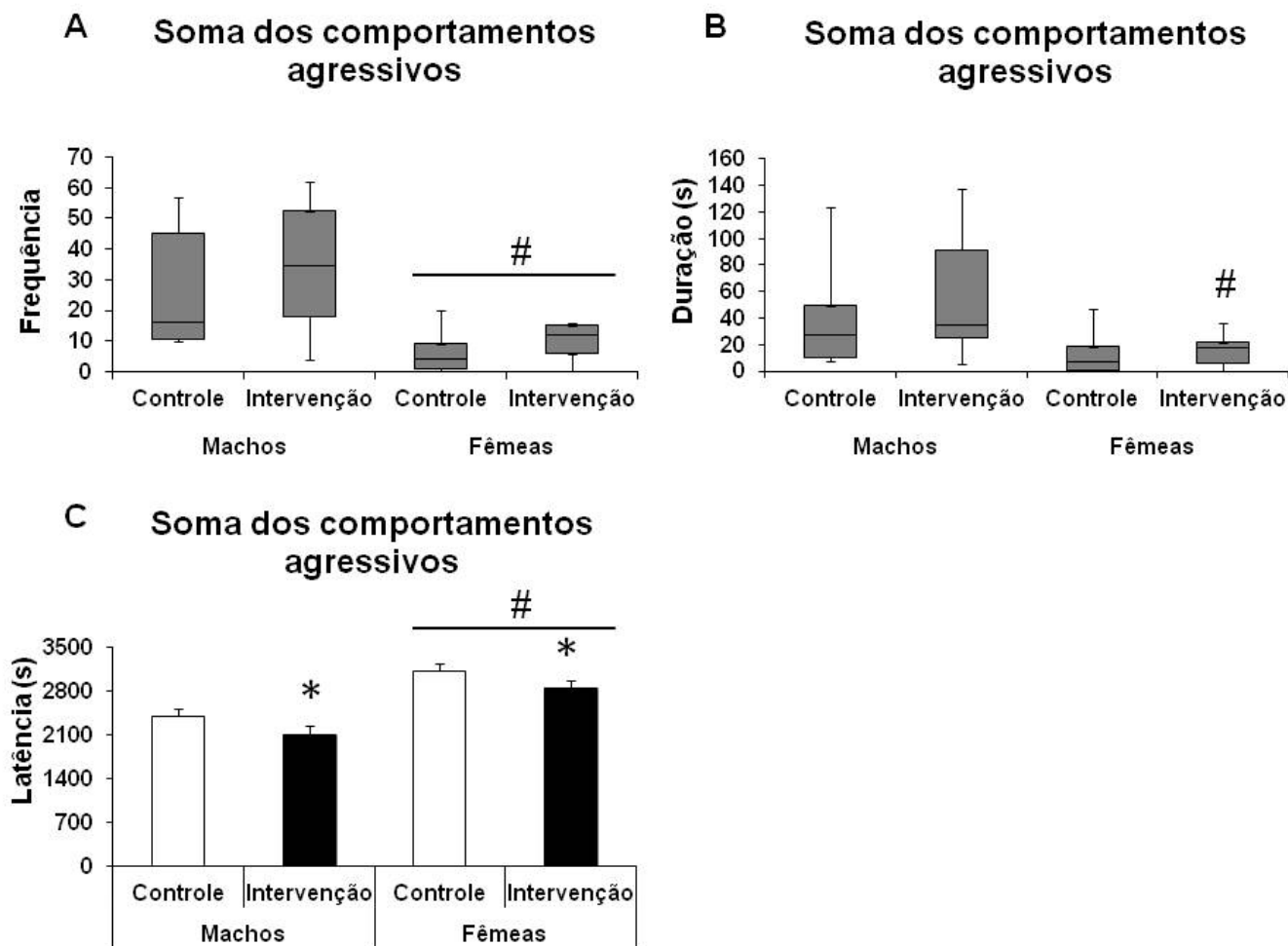
Quanto às interações não-agressivas, a ANOVA de duas vias indicou que fêmeas apresentam menor frequência de cheirar do que machos [ $F_{(1,36)} = 20,23$ ;  $P = 0,001$ ] (Figura 15A). Não foram encontradas diferenças significativas quanto à duração e à latência do comportamento de cheirar. Adicionalmente, o teste de Kruskal-Wallis indicou que fêmeas do grupo Intervenção apresentaram menor frequência e duração no comportamento de montar ( $P = 0,01$ ; Figura 15B e  $P = 0,02$ ; Figura 15C, respectivamente), além de maior latência de montar ( $P = 0,011$ ; Figura 15D).



**Figura 15.** Interações não-agressivas no teste de interação social em adultos (PP87), Controles e Intervenção (expostos à provocação social em PP2 e PP5), machos e fêmeas. **(A)** Frequência do comportamento de cheirar; **(B)**, **(C)** e **(D)**: frequência, duração e latência do comportamento de montar, respectivamente,  $n = 10/\text{grupo}$ . # Diferente dos machos,  $P = 0,001$ ; \* fêmeas Intervenção diferentes dos demais grupos,  $P < 0,05$ .

Quanto às interações agressivas, foi realizada uma soma dos comportamentos agressivos (morder, boxear, ataques lateral e frontal), para analisar esse parâmetro de maneira mais simples e clara. Para esses parâmetros, o teste de Kruskal-Wallis revelou que as fêmeas apresentam menores frequências e duração de comportamentos agressivos do que machos ( $P = 0,01$ ; Figura 16A e  $P = 0,033$ ; Figura 16B, respectivamente). Em contrapartida, a ANOVA de duas vias indicou que fêmeas apresentam maior latência para esse mesmo comportamento [ $F_{(1,36)} = 30,01$ ;  $P = 0,0001$ ] (Figura 16C). A provocação social no período pós-parto das mães

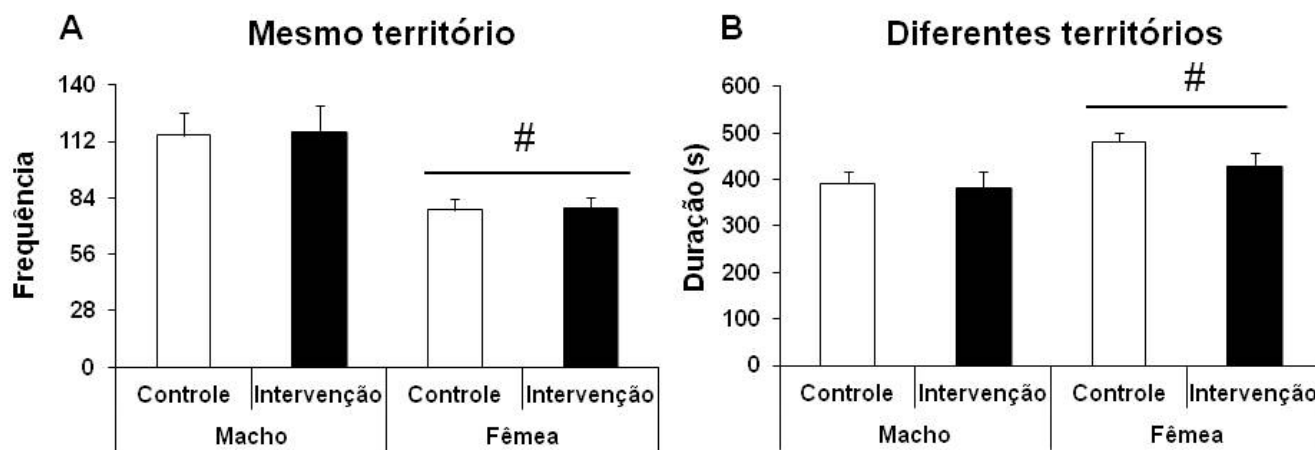
dos animais do grupo Intervenção mostrou afetar o comportamento dos ratos adultos reduzindo a latência para comportamento agressivos, independentemente do gênero [ $F_{(1,36)} = 4,55$ ;  $P = 0,04$ ] (Figura 16C).



**Figura 16.** Soma dos comportamentos agressivos no teste de interação social em adultos (PP87), Controles e Intervenção (expostos à provocação social em PP2 e PP5), machos e fêmeas. **(A)** Frequência, **(B)** duração e **(C)** latência dos comportamentos agressivos,  $n = 10$ /grupo. \* Diferente do grupo Controle,  $P = 0,04$ ; # diferente dos machos,  $P < 0,05$ .

Quanto aos comportamentos não-sociais (presença no mesmo território, sem interações sociais ou permanência em territórios diferentes) a ANOVA de duas vias mostrou que fêmeas dividindo mesmo território apresentaram menor frequência de interação social do que machos

nas mesmas condições [ $F_{(1,36)} = 15,37; P = 0,0001$ ] (Figura 17A). Fêmeas também despendem mais tempo do que machos, isoladas, em diferentes territórios, independentemente de pertencerem ao grupo Intervenção ou Controle [ $F_{(1,36)} = 6,05; P = 0,019$ ] (Figura 17B). Não foram encontradas diferenças nos demais parâmetros, tais como o tempo de permanência no mesmo território sem apresentar comportamentos sociais e nas frequências dos animais em diferentes territórios (representações gráficas omitidas).

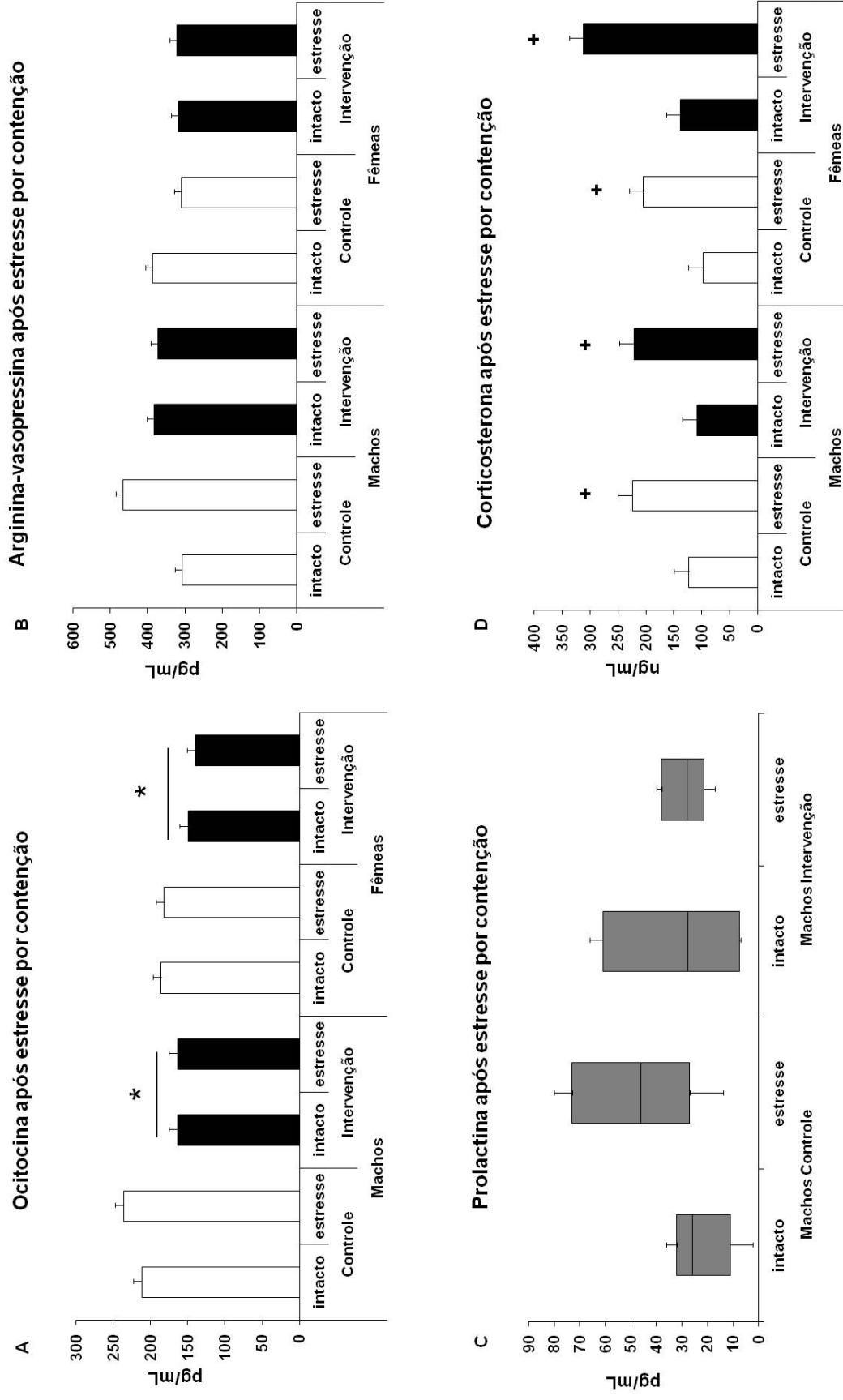


**Figura 17.** Comportamentos não-sociais no teste de interação social em adultos (PP87), Controles e Intervenção (expostos à provocação social em PP2 e PP5), machos e fêmeas. **(A)** Frequência de comportamentos não-sociais no mesmo território ( $P = 0,0001$ ), **(B)** duração de permanência em diferentes territórios ( $P = 0,019$ ). ANOVA de duas vias,  $n = 10$ /grupo. # Diferente dos machos.

#### 7.3.4 Estresse por contenção

A ANOVA de três vias revelou que os animais adultos do grupo Intervenção, os quais foram expostos à provocação social em PP2 e PP5, apresentaram redução significativa na concentração plasmática da OT, independentemente do estresse de contenção ou do gênero [ $F_{(1,37)} = 5,55; P = 0,02$ ] (Figura 18A). Além disso, CORT plasmática aumentou nos animais submetidos ao estresse de contenção [ $F_{(1,38)} = 17,68; P = 0,0001$ ], porém não houve efeito da

intervenção (Figura 18D). As concentrações plasmáticas de AVP e PRL não alteraram pelo estresse de contenção ou intervenção (Figura 18B e 18C, respectivamente). Problemas técnicos inviabilizaram as amostras de PRL das fêmeas, sendo os resultados apresentados apenas para os machos (Figura 18C).



**Figura 18.** Hormônios plasmáticos após estresse por contenção em adultos (PP90), Controles e Intervenção (expostos à provocação social em PP2 e PP5), machos e fêmeas. (A) Oxitocina, (B) Arginina vasopressina, (C) prolactina e (D) corticosterona. ANOVA de três vias, n = 5-7/grupo. \* Diferente dos controles ( $P = 0,02$ ). + Diferente do grupo intacto (não estressado) ( $P = 0,0001$ ).



*Discussão*

---

## 8. Discussão

Já está bem estabelecida na literatura a importância da mãe para sua cria, pois ela modula nos neonatos a expressão de respostas comportamentais, endócrinas e reações frente a situações estressantes (LEVINE, 2001; WALKER et al., 2004), assim como modula o desenvolvimento cognitivo e emocional, além de transmitir informações ambientais para a sua prole (CHAMPAGNE et al., 2003; CIRULLI et al., 2003; MASHOODH et al., 2009; MCLEOD et al., 2007; MEANEY 2001; PARENT et al., 2005; SHERIFF et al., 2010). Presume-se que os efeitos na prole de intervenções neonatais são devidos principalmente a alterações do comportamento maternal e à interrupção da relação mãe-filhote (DENENBERG, 1999; MACRÌ et al., 2008; PRYCE et al., 2001; ZULUAGA et al., 2013). Logo, é relevante a análise do comportamento maternal ao investigar a ontogenia de diversos parâmetros neurais e comportamentais na prole, assim como o impacto das influências ambientais no início da vida do animal.

A intervenção no ambiente neonatal utilizada neste trabalho levou a uma alteração pontual no comportamento maternal analisado de forma cumulativa (em PP3, PP4 e PP6), aumentando a presença da mãe no ninho. O presente resultado é similar ao encontrado em um estudo anterior (HENRIQUES et al., 2014), no qual ratas que naturalmente lambiam mais os filhotes apresentaram tendência de maior presença no ninho. Essa alteração encontrada nas ratas lactantes expostas à provocação social pode ser devida ao fato das mães perceberem o ambiente como hostil e, então, permanecerem menos tempo longe dos seus filhotes para protegê-los. Este achado poderia ser relacionado a estudos em humanos, nos quais mães expostas à violência doméstica apresentam um aumento compensatório do comportamento maternal (LETOURNEAU et al., 2007, 2013). No entanto, não encontramos diferenças no comportamento de lambida, sendo este comportamento um fator de grande importância no desenvolvimento das crias – conforme é observado em outras intervenções perinatais e em

estudos levando em conta diferenças naturais de cuidado maternal (LIU et al., 1997; MEANEY 2001; SMYTHE et al, 1994). A manipulação neonatal, por exemplo, é um modelo de intervenção que leva a mãe a aumentar a frequência do comportamento de lambida (DE AZEVEDO et al., 2010; LIU et al., 1997). Por outro lado, o estresse pré-natal por contenção em ratas prenhes leva à atenuação do comportamento materno, sendo observado pela redução na frequência de lambidas e na presença no ninho (DE SOUZA et al., 2012).

Outros autores demonstraram que intervenções no ambiente neonatal, como a exposição da díade mãe-ninhada a estímulos socialmente aversivos, promovem modificações no comportamento materno (CARINI et al., 2013; NEPHEW & BRIDGES, 2011; VEIGA et al., 2011a; ZULUAGA et al., 2013). Em um desses estudos, foram descritos os efeitos agudos da provocação social sobre parâmetros comportamentais e hormonais nas mães (VEIGA et al., 2011a). Os autores relataram que o comportamento maternal total foi significativamente reduzido em lactantes durante a exposição à provocação social, mostrando que esse procedimento interrompe a interação mãe-filhote. Isso é devido à rata lactante apresentar comportamentos investigativos e agressivos em relação aos machos, desta forma diminuindo o cuidado maternal. Ao analisar os hormônios envolvidos nas respostas ao estresse nas lactantes submetidas a machos provocadores, foi encontrada uma redução dos níveis plasmáticos de CORT e PRL. Ademais, quando as lactantes foram submetidas apenas aos intrusos foi observada diminuição não apenas nos níveis de CORT e PRL, mas também na OT e progesterona plasmáticas. A alteração dos níveis de OT, PRL e progesterona, os quais são hormônios envolvidos no comportamento maternal (NEMSADZE & SILAGAVA, 2010; NUMAN, 2006), pode ter influenciado as alterações comportamentais relatadas naquele trabalho (VEIGA et al., 2011a).

Estudo prévio de ZULUAGA e colaboradores (2013) demonstraram que quando a mãe e a ninhada são expostas por um período prolongado a um estresse social (presença de machos

não-familiares), as mães tiveram maior frequência de permanecer fora do ninho e diminuíram as posturas de amamentação, no entanto, apresentaram um aumento na frequência de lambidas. Por outro lado, outros estudos com estresse crônico social na díade mãe-filhotes relataram atenuação do comportamento maternal, tais como duração reduzida do comportamento de lambida (CARINI et al., 2013; NEPHEW & BRIDGES, 2011). Em relação aos presentes achados, pode-se inferir que a mudança em um comportamento maternal específico pode ser devido a diferenças na frequência e na severidade do protocolo de intervenção usado, assim como o momento em que o comportamento maternal foi observado (durante ou após a intervenção). Contudo, seriam necessárias mais investigações para determinar quais elementos da intervenção usada no presente estudo de fato alteraram o comportamento maternal: os machos instigadores, os machos intrusos, ou o efeito sinérgico de ambos.

Uma vez que intervenções no início da vida modificam a relação recíproca mãe-filhote (CIRULLI et al., 2003; MACRÍ et al., 2008; PRYCE et al., 2001; RAINEKI et al., 2013), a participação dos neonatos também foi considerada no presente trabalho. O experimento usado para avaliar o comportamento afiliativo em filhotes, o teste da preferência olfatória em PP7, considera o tempo gasto no lado da maravalha do ninho como uma medida de afiliação do neonato em relação à sua mãe, o qual é um comportamento social precoce (RAINEKI et al., 2013; SULLIVAN & WILSON, 2003). O presente estudo constatou que os animais submetidos à provocação social em PP2 e PP5 passaram menos tempo no lado da maravalha do ninho comparado aos Controles. Em outras palavras, a intervenção neonatal usada neste estudo levou à redução do comportamento afiliativo dos neonatos. Quando analisado separadamente o parâmetro tempo em contato com a maravalha do ninho, foi encontrada uma tendência dos animais do grupo Intervenção de apresentarem medidas menores, sugerindo novamente que esses animais procuraram o ninho menos ativamente em relação aos

Controles. Comparando o efeito encontrado do estímulo socialmente aversivo usado com estudos realizados em humanos, crianças expostas à violência doméstica podem desenvolver um vínculo inseguro ou desorganizado com seus provedores (LEVENDOSKY et al., 2012). Ademais, vínculos inseguros ou desorganizados em crianças, decorrentes de casos de violência doméstica, maus-tratos, abuso ou negligência, são associados com psicopatologias subsequentes (LEVENDOSKY et al., 2012; LOWELL et al., 2014).

É importante levar em conta que fatores parentais podem agir como um sinalizador das condições ambientais para a prole (YOUNGSON & WHITELAW, 2008), conforme é demonstrado com estudos de cuidado maternal em ratos e coelhos (MCLEOD et al., 2007; SHERIFF et al., 2010). Uma vez que um rato macho adulto não-familiar representa uma ameaça ecologicamente relevante a neonatos (PAUL & KUPFERSCHMIDT, 1975; MENNELLA & MOLTZ, 1988), também pode ser sugerido que a redução da procura pelo ninho seja uma evitação adaptativa a um ambiente social hostil causado pela provocação social – apesar da circuitaria de medo incondicionado a machos adultos não-familiares responder apenas a partir do dia 14 de vida (CHEN et al., 2006). Semelhantemente ao presente resultado, estudos com outras intervenções perinatais, tais como o estresse pré-natal e a manipulação neonatal, também relataram prejuízos no desempenho dos filhotes no teste de preferência olfatória (RAINEKI et al., 2009, 2013; DE SOUZA et al., 2012). Ademais, pode-se dizer que a provocação social, assim como esses modelos de intervenções perinatais, leva a alterações na relação recíproca mãe-filhote. Contudo, é interessante observar que, independente da intervenção aumentar o comportamento maternal – no caso da provocação social e da manipulação neonatal (DE AZEVEDO et al., 2010; LIU et al., 1997) – ou diminuí-lo – no caso do estresse pré-natal (DE SOUZA et al., 2012) – igualmente há prejuízo na preferência olfatória dos filhotes. Logo, pode-se sugerir que o déficit do comportamento afiliativo dos neonatos causado pelas intervenções perinatais possa ser mediado apenas pela

alteração do vínculo mãe-filhote, independente do comportamento maternal estar aumentado ou diminuído.

Além dos aspectos comportamentais mencionados, tem sido investigada também a fisiologia subjacente aos comportamentos sociais no início da vida. Conforme abordado na introdução, sistemas neuroendócrinos – principalmente os relacionados à OT e à AVP – têm um papel-chave em comportamentos afiliativos (HEINRICHS & DOMES, 2008; NEUMANN & LANDGRAF, 2012). Ademais, eventos no início da vida podem afetar esses sistemas (VEENEMA, 2012). Dessa maneira, o presente trabalho investigou se a intervenção neonatal usada – a provocação social – afeta as respostas hormonais dos animais.

O presente trabalho mostrou que filhotes em PP7 expostos à provocação social, juntamente com sua mães, em PP2 e PP5, apresentaram diminuição dos níveis plasmáticos de OT. Pode-se sugerir que o prejuízo no desempenho de filhotes do grupo Intervenção no teste de preferência olfatória pode ser relacionado com os níveis plasmáticos diminuídos de OT analisada imediatamente após o teste. De maneira semelhante aos presentes resultados, foi relatado que a administração de um antagonista da OT em filhotes reduz a preferência por odores associados à mãe (CROMWELL, 2011; KOJIMA & ALBERTS, 2011, NELSON & PANKSEPP, 1996). Estudos realizados com camundongos *knockout* para OT encontraram diminuição das vocalizações ultrassônicas dos filhotes quando foram separados das mães, assim como latência aumentada para rastejarem até a mãe, indicando prejuízo na formação de vínculos sociais no início da vida (LIM & YOUNG, 2006; YOUNG et al., 1997). NELSON & PANKSEPP (1996) já haviam sugerido que, em ratos, a OT pode ser responsável pelo comportamento de procura e aproximação por cheiro associado à mãe e KOJIMA e colaboradores (2012) relataram que filhotes de ratos apresentaram procura pelo odor da mãe aumentada pela OT hipotalâmica.

A ausência de diferença nos testes motores em ambos os grupos, e a redução da OT nos animais submetidos à provocação social, apoiam a hipótese de que a diferença na procura da maravalha do ninho observado no grupo Intervenção seja devida à diminuição da motivação e da recompensa do comportamento afiliativo, sem envolver influências motoras (CROMWELL, 2011; NELSON & PANKSEPP, 1996, 1998). Além da diferença da OT entre animais Controles e Intervenção, também foi encontrada diferença na OT entre os sexos, sendo que as fêmeas apresentaram menores níveis plasmáticos comparados aos machos. Ao levar em conta que filhotes os quais recebem mais lambidas das mães têm maior liberação de OT (HENRIQUES et al., 2014), e que as ratas lactantes naturalmente lambem mais os filhotes machos do que as fêmeas (MOORE, 1992, 2007; MOORE & MORELLI, 1979), esse resultado do presente trabalho pode ser explicado devido à combinação desses fatores.

Além dos níveis diminuídos de OT, foi encontrado que a intervenção usada neste trabalho também diminuiu os níveis plasmáticos de PRL. Baseado nesses achados, deve-se considerar o fato de que a OT e a PRL estimulam de maneira recíproca as suas liberações (CLAPP & DE LA ESCALERA, 2011). Logo, esse mecanismo neuroendócrino pode explicar a redução paralela de PRL e OT plasmáticas encontradas nos animais submetidos à provocação social. Além da regulação do comportamento maternal (LARSEN & GRATAN, 2012), investigações recentes têm implicado a PRL em outras mudanças comportamentais, agindo em seus receptores distribuídos pelo encéfalo (PATIL et al., 2014). Apesar de não haver estudos na literatura quanto ao papel da PRL no vínculo em filhotes, pode-se sugerir que a redução dos níveis desse hormônio causada pela intervenção também possa estar envolvida no prejuízo no desempenho no teste de preferência olfatória. Não obstante, um estudo realizado em humanos encontrou que variações alélicas nos genes associados à sinalização de PRL e OT estão relacionadas aos transtornos do espectro autista (YRIGOLLEN et al., 2008), o que pode ser comparado à redução no comportamento

afiliativo e nos níveis de OT e PRL encontrados nos filhotes Intervenção neste trabalho. Ao levar em conta estudos anteriores os quais sugeriram que, durante a amamentação, OT e PRL, juntamente com outras moléculas, são liberadas no leite materno para a cria (CARTER 1998, 2003; ELLIS et al., 1996) e o relato de que a provocação social diminui os níveis plasmáticos de PRL (VEIGA et al., 2011a), também pode-se sugerir que a PRL plasmática reduzida em filhotes do grupo intervenção seja devido a esses fatores.

Diferentemente da OT e da PRL, foi encontrado que a provocação social aumentou os níveis plasmáticos de AVP no filhotes em PP7. Da mesma forma que a OT, a AVP também está implicada na mediação de comportamentos afiliativos, na aproximação social e na memória social (FRANCIS et al., 2002; HEINRICHS & DOMES, 2008; VEENEMA, 2012). Tem sido relatado que deficiências nos sistemas vasopressinérgicos e ocitocinérgicos podem estar envolvidas em déficits sociais observados em transtornos particulares, tais como os transtornos do espectro autista (LUKAS & NEUMANN, 2013; YRIGOLLEN et al., 2008). De forma semelhante a esses estudos em humanos, SCHANK (2009) relatou que filhotes deficientes em AVP apresentam prejuízos sociais. Apesar desse estudo também ter relatado que filhotes de ratos deficientes em AVP apresentarem desenvolvimento locomotor acelerado, no presente trabalho não foi observada diferença na locomoção entre os grupos. O estudo de SCHANK (2009) usou uma linhagem de animais deficientes de AVP, ao passo que no presente estudo os níveis aumentados de AVP foram induzidos por uma intervenção no período neonatal. Contudo, uma vez que a atividade equilibrada da OT e da AVP é importante para comportamentos emocionais adequados (NEUMANN & LANDGRAF, 2012), a alteração dos níveis da AVP causada pela provocação social, mesmo que aumentados, pode ter influenciado os déficits dos filhotes no teste de preferência olfatória.

Conforme já mencionado, as alterações causadas na OT, PRL e AVP plasmáticas pela provocação social podem estar relacionadas aos déficits encontrados no teste de preferência



olfatória em PP7. Essa base endócrina para comportamentos afiliativos em filhotes estaria de acordo com relatos em estudos anteriores realizados em animais e em humanos (FRIES et al., 2005; HEINRICHS & DOMES, 2008; NEUMANN & LANDGRAF, 2012; LUKAS & NEUMANN, 2013; SCHANK, 2009; YRIGOLLEN et al., 2008). Uma vez que os níveis plasmáticos desses hormônios podem estar diretamente relacionados aos níveis centrais, deve ser levado em conta que a provocação social pode também ter levado a alterações nos níveis centrais desses hormônios, principalmente em estruturas encefálicas envolvidas em comportamentos sociais, tais como o hipotálamo, a amígdala e o núcleo *accumbens* (CARSON et al., 2014; CORIA-AVILA et al., 2014; NEUMANN & LANDGRAF, 2012; STEIN, 2009; STEVENS et al., 2013; YOUNG et al., 2001). Além disso, também é possível que a provocação social possa ter afetado o circuito amígdala-LC-bulbo olfatório envolvido na aprendizagem olfatória, o qual pode ser afetado por eventos perinatais (DE SOUZA et al., 2012; MORICEAU et al., 2009; RAINEKI et al., 2009).

Quanto aos níveis plasmáticos de CORT em PP7, não foram encontradas diferenças entre os grupos. Já está bem estabelecido na literatura que ratos neonatos são hiporresponsivos ao estresse até o 14º dia de vida (LEVINE, 2001). Neste período, a exposição a machos adultos não-familiares não induz respostas endócrinas ou comportamentais de medo (HARD et al., 1982; MORICEAU et al., 2004; TAKAHASHI, 1992a,b). Ademais, a presença de machos adultos não ativam, em filhotes, as áreas neurais relacionadas ao medo, tais como a amígdala, a qual está imatura durante esse período neonatal (WIEDENMAYER & BARR, 2001). À medida que o período hiporresponsivo ao estresse acaba (entre PP12 e PP14) os filhotes começam a demonstrar respostas fisiológicas e comportamentais de medo a machos adultos. Isso é caracterizado pelo declínio nas vocalizações ultrassônicas, na atividade locomotora, aumento na expressão de c-fos de amígdala e aumento na secreção de ACTH (TAKAHASHI, 1992a,b; WIEDENMAYER &

BARR, 2001). Logo, os resultados obtidos no presente estudo referentes à CORT plasmática podem ser devidos ao fato de que os animais em PP7 ainda não apresentam respostas endócrinas à presença de machos não-familiares.

Conforme mencionado anteriormente, durante os primeiros dias de vida, os filhotes são sensíveis a influências ambientais, tais como diferentes intensidades de cuidado maternal e a estressores (LEVINE, 2001; WALKER et al., 2004). A prole exposta a intervenções neonatais pode apresentar alterações em parâmetros comportamentais e neurobiológicos, tanto a curto como a longo prazo (ARNOLD & SIVIY, 2002; LEHMANN & FELDON, 2000; MEERLO et al., 1999; RAINEKI et al., 2013). Perturbações ambientais no período neonatal em ratos, tais como a separação maternal e a exposição a outros estressores, além de influenciar parâmetros neurobiológicos, podem também afetar o ganho de peso (HUPPERTZ-KESSLER et al., 2012; LAJUD et al., 2012). As variações no cuidado maternal podem influenciar o neurodesenvolvimento dos filhotes, conforme observado por URIARTE e colaboradores (2007), onde a prole de ratas muito lambedoras apresentaram abertura ocular mais precoce comparada à prole de ratas pouco lambedoras. Apesar de termos encontrado diferença na presença da mãe no ninho entre as mães Controles e as submetidas à intervenção quando analisadas cumulativamente, a provocação social não influenciou a abertura ocular e o peso dos filhotes. Este achado está de acordo com o encontrado por ZULUAGA e colaboradores (2013), onde também a díade mãe-ninhada foi exposta a estímulos socialmente aversivos, porém não houve alteração no peso dos filhotes. No entanto, o trabalho de NEPHEW e BRIDGES (2011) mostrou que o estresse social crônico em ratas lactantes induzido por machos intrusos diminuiu o ganho de peso dos filhotes. Esses diferentes estudos sugerem que os efeitos encontrados nos filhotes podem depender da severidade do protocolo experimental de intervenção utilizado.

Os testes motores em PP7 – tais como o campo aberto, o geotaxis negativo e endireitamento – foram usados como controle negativo do teste de preferência olfatória. A ausência de diferença entre os grupos na avaliação motora dos filhotes indicou que não houve influência do desempenho motor no teste de preferência olfatória. De maneira semelhante à intervenção neonatal usada no presente trabalho, FARKAS e colaboradores (2009) não encontraram efeito da separação maternal nas habilidades motoras de filhotes. No entanto, diferente da provocação social, outros modelos de intervenção neonatal, tais como a privação maternal, podem levar a retardo no desenvolvimento neural em filhotes, como por exemplo: atraso na abertura ocular, na motricidade e redução de ganho de peso (ELLENBROEK et al., 2005).

No experimento seguinte foi avaliado o efeito da provocação social em PP2 e PP5 sobre o comportamento de brincadeira em juvenis (PP30), considerado uma das formas precoces de comportamento social (PELLIS & PELLIS, 1991; TREZZA et al., 2010). Os presentes resultados revelaram que os ratos juvenis, os quais foram expostos à provocação social em PP2 e PP5 (Intervenção), não apresentaram diferenças no comportamento de ataque, reconhecido como uma solicitação de brincar de luta entre roedores (PELLIS & PELLIS, 1998; VANDERSCHUREN et al., 1997), nem no saltitar, boxear, perseguir ou cheirar. No entanto, o comportamento de supinação, caracterizado como brincadeira de luta entre roedores (PELLIS & PELLIS, 2009; TREZZA et al., 2010), foi diminuído no grupo Intervenção. Esses resultados – o comportamento de supinação afetado, mas não o ataque – podem ser interpretados como um índice de menor “ludicidade” (“*playfulness*”) por alguns autores (PELLIS & PELLIS, 1990, 1991; SIVIY & HARRISON, 2008).

Quanto à supinação, também houve diferença de gênero, sendo que as fêmeas apresentaram menores frequências. Esse resultado está de acordo com a literatura, pois há um dimorfismo sexual em juvenis no comportamento de brincadeira, especialmente no que se

refere a brincar de luta, tipicamente reduzido entre fêmeas (COOKE & SHUKLA, 2011; MEANEY, 1988; PELLIS, 2002).

Considerando-se a soma das frequências dos diferentes comportamentos de brincadeira, também observamos redução significativa dos mesmos no grupo Intervenção. Uma vez que o comportamento de brincadeira em juvenis é relevante para o desenvolvimento de comportamentos sociais na vida adulta (AUGER & OLESEN, 2009; VAN DEN BERG et al., 1999; VON FRIJTAG et al., 2002), é possível que as alterações encontradas em PP30 – no caso deste trabalho, na supinação – possam ter influenciado o desenvolvimento dos comportamentos agonísticos subsequentes em adultos, conforme os presentes resultados encontrados. É importante levar em conta que, conforme sugerido por alguns pesquisadores, a brincadeira de luta é considerada uma forma juvenil de comportamento agonístico, o qual precede os comportamentos agressivos em adultos (DELVILLE et al., 2005; PANKSEPP et al., 1984; PELLIS, 2002; VEENEMA & NEUMANN, 2009).

Conforme abordado anteriormente, o comportamento de brincadeira em juvenis pode ser influenciado pela qualidade do cuidado maternal ou por intervenções experimentais no início da vida. De fato, filhotes de roedores cujas mães apresentam maior cuidado maternal, com elevada frequência de lambidas no período neonatal, apresentam redução do comportamento de brincadeira (PARENT et al., 2013). Esse resultado é semelhante ao mostrado aqui, pois os juvenis que tiveram redução no comportamento de brincadeira são oriundos de mães que apresentaram aumento no comportamento maternal (presença no ninho) sendo que, neste caso, o comportamento da mãe foi influenciado pela provocação social. Além da intervenção usada no presente trabalho, outros modelos de intervenções perinatais também afetam o comportamento de brincadeira em juvenis. Por exemplo, o estresse pré-natal em ratas prenhes, nos dias de gestação 14 até 21, reduz os níveis de supinação na prole analisada em PP31 (WARD & STEHM, 1991). Além disso, ratos machos expostos à

manipulação neonatal diária de PP1 até PP10, por 1 min, apresentam redução nos comportamentos de ataque e de perseguir em PP25, PP30 e PP35 (KARKOW et al., 2013). No entanto, em outro protocolo de manipulação neonatal – envolvendo separações da mãe por 15 min de PP2 até PP15 – foi encontrado aumento do ataque e da supinação em juvenis (SIVIY & HARRISON, 2008). A separação maternal de PP1 a PP14, também leva a alterações no comportamento de brincadeira, aumentando o comportamento de ataque, porém, reduzindo a supinação (VEENEMA & NEUMANN, 2009).

A maior sensibilidade destes estudos em detectar alterações em diferentes comportamentos de brincadeira comparados com o presente estudo poderia ser justificado pelo fato de que aqui o registro comportamental de cada colônia de juvenis foi de apenas um dia, diferentemente da frequência de registros realizados na maioria destes outros estudos. É possível, portanto, que se fosse realizado um registro mais extenso, observássemos diferenças adicionais no comportamento de brincadeira entre juvenis. A maior sensibilidade daqueles estudos também poderia ser justificada pela frequência de exposição à situação estressora, bem como o grau de severidade do estresse. O tempo de exposição ao agente estressor, bem como variações nos cuidados maternos, peculiar de cada rata, poderiam repercutir no comportamento dos juvenis. No seu conjunto, esses resultados mostram que estresse e alterações ambientais podem interferir no comportamento de brincadeira em juvenis e este pode ser determinante para o desenvolvimento encefálico e para os comportamentos na vida adulta. Não descartamos porém, que a diminuição do comportamento de brincadeira seja resultado de uma resposta adaptativa da prole, uma vez que os filhotes permaneciam na caixa junto com a mãe durante a provocação social em PP2 e PP5. Então, a redução da atividade (comportamento de brincadeira) entre ratos juvenis poderia ser interpretada como um modo de evitar a detecção por predadores e de responder a um ambiente socialmente hostil, pois se sabe que machos adultos podem apresentar comportamentos agressivos ou infanticidas no

período neonatal, mesmo contra sua própria prole (EBENSPERGER, 1998; COOKE & SHUKLA, 2011; SIVIY & HARRISON, 2008).

A provocação social em ratas lactantes durante o período pós-parto não afetou CORT, OT e PRL plasmáticas quando avaliada em juvenis em PP31. Tais resultados podem ser justificados pela idade dos animais, uma vez que ratos submetidos à intervenção neonatal em outros estudos apresentam diferenças na PRL plasmática somente após a puberdade (SEVERINO et al., 2004). Também deve ser levada em conta a variação circadiana hormonal e a atividade pulsátil do eixo HHA, pois as amostras de plasma nesse estudo foram coletadas durante o período escuro, que sabidamente apresenta menores concentrações hormonais (LIGHTMAN et al., 2000). Quanto à ausência de diferenças na OT, esse resultado estaria de acordo com o de VEENEMA e colaboradores (2013), no qual a injeção intracerebroventricular (ICV) de um antagonista de OT não causou alterações no comportamento de brincadeira de ratos juvenis (PP35). Contudo, a administração de OT sintética no septo lateral reduz o comportamento de brincadeira em fêmeas (entre PP33 e PP36) (BREDEWOLD et al., 2014). Interessantemente, a redução do comportamento de brincadeira nos animais Intervenção foi acompanhada por uma diminuição na AVP plasmática. Esse resultado pode ser comparado com estudos que relacionam a atividade da AVP com a regulação do comportamento de brincadeira. Similarmente aos presentes achados, o antagonismo da AVP no hipotálamo diminui o comportamento de brincadeira em hamsters, principalmente o comportamento de ataque em PP35 (CHENG & DELVILLE, 2009). Outros estudos também mostram que o aumento da ativação de neurônios vasopressinérgicos no hipotálamo ocorre após a consumação da luta de brincadeira em hamsters juvenis em PP35 (CHENG & DELVILLE, 2008). Contudo, o aumento da expressão de mRNA da AVP no hipotálamo e no núcleo próprio da estria terminal em ratos submetidos à separação maternal foi acompanhado por um aumento do comportamento de brincadeira de ataque em PP35

(VEENEMA & NEUMANN, 2009). Baseado nesses achados, sugere-se que poderia haver diferenças entre os grupos nos níveis centrais dos hormônios envolvidos em comportamentos sociais – tais como a OT e a AVP – o que poderia ser relacionado às reduções encontradas nos comportamentos sociais em indivíduos juvenis (LIM et al., 2005; GORDON et al., 2011; HIGASHIDA et al., 2012; KARKOW et al., 2013; VEENEMA, 2012; VEENEMA et al., 2013; WANG et al., 2012). O estudo dos aspectos hormonais do comportamento de brincadeira pode ser útil na investigação de transtornos humanos, tais como no autismo juvenil, no transtorno de hiperatividade e déficit de atenção, depressão e esquizofrenia (COOKE & SHUKLA, 2011; VANDERSCHUREN et al., 1997).

Eventos ambientais que ocorrem no início da vida, tais como o estresse e as variações na intensidade de cuidado maternal, podem ter efeitos duradouros em uma ampla variedade de comportamentos, tais como ansiedade, interação social e respostas ao estresse na idade adulta (LABAN et al., 1995; ROTS et al., 1996; ARNOLD & SIVIY, 2002; LEHMANN & FELDON, 2000; MEERLO et al., 1999; RAINEKI et al., 2013; KAFFMAN & MEANEY, 2007). Para avaliar os possíveis efeitos da intervenção neonatal – provocação social em PP2 e PP5 – sobre a ansiedade na prole adulta, foram realizados neste estudo os testes de campo aberto e de labirinto em cruz elevado. Quanto ao campo aberto, utilizado para avaliar locomoção e ansiedade nos ratos adultos, não foram observadas variações resultantes da intervenção neonatal. A intervenção também não causou alterações de comportamento no labirinto em cruz elevado na prole adulta. Dados da literatura quanto ao efeito de diferentes protocolos sobre a ansiedade na prole adulta de mães que sofreram intervenção no período perinatal são controversos. Animais submetidos à manipulação neonatal ou aqueles filhotes de mães com elevada frequência de lambidas apresentam redução da ansiedade quando testados na vida adulta (PADOIN et al., 2001; URIARTE et al., 2007). Por outro lado, animais submetidos à separação maternal ou aqueles cujas mães apresentam menor intensidade de

lambidas no período neonatal, mostram maior ansiedade quando adultos (LEHMANN & FELDON, 2000; MEANEY, 2001; URIARTE et al., 2007). No modelo de estresse proposto aqui, não observamos o efeito da intervenção sobre a ansiedade na idade adulta. Tais divergências poderiam ser justificadas pelos diferentes protocolos de intervenção. No entanto, fêmeas dos grupos Intervenção e Controle apresentaram maior percentagem de entradas nos braços abertos e, conseqüentemente, menor percentagem de entradas nos braços fechados, evidenciando menor ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado quando comparadas aos machos. Tais diferenças de sexo também foram observadas por outros autores (JOHNSTON & FILE, 1991; MARCONDES et al., 2001; STARR-PHILLIPS & BERRY, 2014; ZIMMERBERG & FARLEY, 1993).

Como anteriormente apontado, os comportamentos sociais são amplamente encontrados em espécies animais como os mamíferos, incluindo desde roedores até humanos (CARTER & KEVERNE, 2002). Assim, estudos sob a óptica evolutiva, etológica e fisiológica são fundamentais no entendimento dos aspectos básicos do comportamento social, bem como na melhor compreensão de transtornos relacionados a disfunções sociais (CHOLERIS et al., 2004; LUKAS & NEUMANN, 2013; NEUMANN & LANDGRAF, 2012; YRIGOLLEN et al., 2008). Uma vez que os comportamentos sociais em indivíduos adultos podem ser decorrentes de experiências no período perinatal (BOWLBY, 1958; CUSHING & KRAMER, 2005; GUDSNUK & CHAMPAGNE, 2012; VEENEMA, 2009; HARLOW et al., 1965), investigamos neste estudo esses comportamentos pelo teste de interação social. A provocação social na díade mãe-ninhada em PP2 e PP5 não causou mudanças nos comportamentos afiliativos dos ratos adultos, conforme observado pelas frequências, durações e latências do comportamento de cheirar. Também não foi observada interferência da intervenção no período neonatal em comportamentos sociais quando os indivíduos estavam no mesmo território ou em territórios diferentes nas caixas de teste.



Contudo, a provocação social reduziu a latência dos comportamentos agressivos – ou seja, os ratos adultos submetidos à intervenção iniciaram comportamentos agonísticos mais rapidamente que os Controles.

Trabalhos anteriores realizados com estresse pré-natal ou com manipulação neonatal em ratos demonstraram que, na idade adulta, essas intervenções perinatais diminuem comportamentos afiliativos – tais como o de cheirar – e aumentam os comportamentos agonísticos – ou seja, os agressivos (DE SOUZA et al., 2013; TODESCHIN et al., 2009; VEENEMA, 2012). Os ratos que naturalmente recebem menor frequência de lambidas de suas mães quando filhotes, também apresentam redução dos comportamentos afiliativos e aumento de agressividade no teste do intruso quando adultos (MENARD & HAKVOORT, 2007; STARR-PHILLIPS & BERRY, 2013). Logo, diferente dos achados de outros autores, a intervenção neonatal usada neste trabalho levou a uma alteração específica nos comportamentos agonísticos, sem influenciar os demais comportamentos sociais. O aumento da agressividade em ratos submetidos à intervenção no período neonatal pode ser visto como uma adaptação a um ambiente socialmente adverso e com alta competitividade, a qual foi, possivelmente, induzida pela provocação social durante o período neonatal, uma vez que os filhotes permaneceram na caixa durante a provocação social. Em humanos, a exposição da criança a experiências adversas, como violência doméstica, pode levá-la a apresentar uma série de problemas comportamentais e transtornos mentais a curto ou a longo prazo, tais como: agressividade impulsiva, comportamentos violentos e antissociais e competência social diminuída (BEDI & GODDARD, 2007; CLEMENTS et al., 2008; DODGE et al., 1990; EDLESON 1999; ERNST et al., 2008; FANTUZZO & FUSCO, 2007; HERRENKOHL et al., 2008; HUMPHREYS, 2007; LOEBER & STOUTHAMER-LOEBER, 1998; SPILSBURY et al., 2008).

Experiências sociais durante o período juvenil – assim como o comportamento de brincadeira – contribuem para o desenvolvimento encefálico apropriado que, enfim, ativa a expressão de comportamentos sociais e reprodutivos no adulto, tais como estabelecimento de dominância e de buscar parceria sexual (COOKE & SHUKLA, 2011). Dessa maneira, o aumento da agressividade nos animais adultos submetidos à intervenção também pode ser relacionado à redução encontrada especialmente na brincadeira de luta em juvenis. O estresse pré-natal e a manipulação neonatal, por exemplo, reduzem os comportamentos de brincadeira em ratos juvenis (KARKOW et al., 2013; WARD & STEHM, 1991), porém, aumentam os comportamentos agressivos em ratos adultos (DE SOUZA et al., 2013; TODESCHIN et al., 2009). Ademais, experimentos de privação do comportamento de brincadeira ou isolamento social em roedores juvenis resultam em alteração do desenvolvimento normal motivacional, social e emocional a longo prazo, quando adultos (COOKE & SHUKLA, 2011; HOLT et al., 1999; TANAKA et al., 2010; VAN DEN BERG et al., 1999).

Os resultados obtidos no presente trabalho revelaram que, além do efeito causado pela provocação social, também foram encontradas diferenças quanto ao sexo no teste de interação social: as fêmeas tiveram menor frequência de cheirar, menor frequência e maior latência de comportamentos agressivos, menor frequência sem apresentar comportamentos sociais quando estavam no mesmo território e maior tempo gasto em diferentes territórios. Logo, pode-se dizer que, de modo geral, as ratas adultas apresentaram redução dos comportamentos afiliativos e agonísticos comparados aos machos. Este achado estaria de acordo com estudos anteriores (CARRIER & KABBAJ, 2012; JOHNSTON & FILE, 1991; STACK et al., 2010), sendo que esse dimorfismo sexual no teste pode ser devido à secreção diferenciada de hormônios gonadais na puberdade. Tais hormônios são necessários para o desenvolvimento de sistemas neurais específicos subjacentes à interação social em ratos adultos (FILE & SETH, 2003). Quanto aos resultados dos comportamentos agonísticos em machos e fêmeas,

sugere-se que o teste do intruso seria mais apropriado para analisar o comportamento agressivo dos animais (KOOLHAAS et al., 2013).

Além da análise comportamental realizada nos ratos adultos, também foram avaliadas as respostas da OT, AVP, PRL e CORT plasmáticas ao estresse por contenção. Apesar desse estressor ser considerado estimulador da liberação de OT e PRL (FREEMAN et al., 2000; JEZOVA et al., 1995; ONAKA et al., 2012), os presentes resultados não indicaram alteração dos níveis plasmáticos desses hormônios causados pela contenção. A ausência de efeito do estressor sobre a concentração plasmática de PRL pode ser devido ao fato de que o pico de liberação desse hormônio ocorre aos 15 min (ASAI et al., 2004; SEVERINO et al., 2004; WAKABAYASHI et al., 1971), sendo que a contenção durou 30 min. A AVP, a qual participa da regulação do eixo HHA, é liberada por estressores específicos, tais como: hemorragia, privação de água, hipoglicemia, choque nas patas, nado forçado e derrota social (CARRASCO & VAN DE KAR; ENGELMAN et al., 2004; JEZOVA et al., 1995; PAPADIMITRIOU & PRIFTIS, 2009; SCOTT & DINAN, 1998). No entanto, o estresse agudo por contenção não alterou a concentração plasmática de AVP, corroborando estudos anteriores (HASHIMOTO et al., 1989; JORGENSEN et al., 2002).

Contudo, os presentes resultados indicaram que o estresse por contenção aumentou os níveis plasmáticos de CORT comparados aos animais não submetidos ao estressor (os intactos). Este achado está de acordo com estudos os quais também relataram aumento na concentração plasmática de CORT em ratos expostos de forma aguda ao estresse por contenção (BARHA et al., 2007; BEANE et al., 2002; LING & JAMALI, 2003; TORRES et al., 2001). Quanto a possíveis diferenças entre machos e fêmeas na OT, AVP e CORT, não foi encontrado efeito de sexo nos hormônios plasmáticos, o que vai de encontro com achados na literatura (JEZOVA et al., 1996; TAYLOR et al., 2000; VERMA et al., 2011). Contudo, não

descartamos que tais diferenças sejam encontradas após determinação do ciclo estral, não avaliado nas nossas ratas antes da coleta de sangue.

Segundo trabalhos realizados com intervenções perinatais ou com variações naturais do comportamento maternal em animais, assim como estudos em humanos, o ambiente precoce pode influenciar de forma duradoura as respostas neuroendócrinas ao estresse (HEIM et al., 2008; KAFFMAN & MEANEY, 2007; LEHMANN & FELDON, 2000; LEVINE, 2001; PADOIN et al., 2001). Roedores expostos à manipulação neonatal ou a mães que naturalmente lambem mais seus filhotes apresentam atenuação das respostas ao estresse na vida adulta (PADOIN et al., 2001; MEANEY, 2001), enquanto a exposição à separação maternal ou a menores intensidades de lambidas levam à exacerbação dessas repostas (LEHMANN & FELDON, 2000; MEANEY, 2001). Contudo, a exposição dos ratos à provocação social em PP2 e PP5 – a qual levou à mudança do comportamento maternal – não influenciou as respostas hormonais plasmáticas ao estresse por contenção na vida adulta. A ausência de diferenças entre grupos Controles e Intervenção na concentração de CORT pode ser explicado pela ausência de diferença na frequência de lambidas entre mães controles e provocadas durante o período neonatal. Roedores submetidos à maior intensidade de lambidas naturalmente ou por manipulação neonatal apresentam aumento na expressão de receptores de glicocorticoides no hipocampo via um mecanismo epigenético (MITCHELL et al., 1990, YAU et al., 1997; CHAMPAGNE & CURLEY, 2009). Logo, a maior concentração destes receptores no hipocampo aumenta a eficiência da retroalimentação negativa sobre o eixo HHA, conforme encontrado nas respostas atenuadas ao estresse em ratos manipulados, ou filhotes que receberam mais lambidas naturalmente (PADOIN et al., 2001; MEANEY, 2001; URIARTE et al., 2007). Entretanto, estudos adicionais seriam necessários para afirmar se a intervenção neonatal usada neste trabalho realmente não influencia as respostas ao estresse na vida adulta. A análise temporal da liberação de hormônios após um estresse agudo, o uso de

protocolos de estresse repetido ou crônico, assim como a investigação de parâmetros centrais, seriam modelos úteis. Ademais, também seria interessante o uso de diferentes tipos de estressores, principalmente aqueles com características sociais tais como o isolamento social e a derrota social (ENGELMAN et al., 2004; SMITH & WANG, 2012), uma vez que este trabalho encontrou alterações em comportamentos sociais.

Apesar da falta de efeitos dependentes do sexo e do estresse, foram encontradas diferenças significativas na OT plasmática entre animais adultos Controles e Intervenção, semelhante ao resultado encontrado em filhotes de 7 dias. Isto é, os ratos submetidos à provocação social no período neonatal apresentaram menores concentrações deste hormônio quando adultos comparados aos controles. Os resultados da OT plasmática reduzida em adultos expostos à intervenção podem ser relacionados ao trabalho de MURGATROYD e NEPHEW (2013). Aqueles autores observaram que fêmeas submetidas a um modelo de estresse crônico social no início da vida apresentam expressão central diminuída do gene da OT quando adultas. Interessantemente, já foi descrito que anormalidades nos sistemas ocitocinérgico e vasopressinérgico podem influenciar significativamente o comportamento agressivo, e que a OT tem efeitos antiagressivos (CALCAGNOLI et al., 2013, 2014; LANDGRAF & NEUMANN, 2004). Logo, podemos relacionar os níveis reduzidos do hormônio OT com a agressividade aumentada em ratos submetidos à intervenção no presente trabalho. Para exemplificar essa relação, podem ser mencionados o estresse pré-natal e a manipulação neonatal, pois são intervenções perinatais que, além de aumentarem o comportamento agressivo em ratos adultos, também provocam redução de neurônios ocitocinérgicos no PVN hipotalâmico (DE SOUZA et al., 2013; TODESCHIN et al., 2009).

Diferente do encontrado nos filhotes e nos juvenis, não foram observadas quaisquer diferenças na AVP plasmática entre animais adultos, Controles e Intervenção. Embora a concentração plasmática de AVP não tenha sido diferente, não descartamos que esse

hormônio associado ao comportamento agressivo esteja aumentado nas regiões encefálicas dos ratos submetidos à intervenção (FERRIS, 2005; LANDGRAF & NEUMANN, 2004; NEUMANN & LANDGRAF, 2012; NEUMANN et al., 2010; VEENEMA & NEUMANN, 2008). O circuito da AVP envolvido nos comportamentos agressivos e territoriais (em machos) compreende a amígdala medial, o núcleo próprio da estria terminal, projeções para o septo lateral e regiões hipotalâmicas – principalmente o hipotálamo anterior (DE VRIES & BUJIS, 1983; FERRIS et al., 1997; GOBROGGE et al., 2007; KOOLHAAS et al., 1998). A injeção de AVP no hipotálamo anterior de hamsters reduz a latência para o comportamento agressivo (FERRIS et al., 1997). Ademais, ratos que sofreram manipulação neonatal apresentam, além das alterações mencionadas anteriormente, aumento no número de neurônios vasopressinérgicos no PVN (TODESCHIN et al., 2009). Do mesmo modo, a separação maternal em ratos também pode levar ao aumento da agressividade, assim como à maior expressão de mRNA da AVP no PVN e no SON hipotalâmicos (VEENEMA et al., 2006).

Estudos dos hormônios OT e AVP são muito relevantes para a compreensão das bases fisiológicas dos comportamentos sociais, abrangendo desde comportamentos afiliativos – como o comportamento maternal, a relação mãe-filho e interações sociais positivas entre os indivíduos – até comportamentos agonísticos – no caso da agressividade (HEINRICHS & DOMES, 2008; NEUMANN & LANDGRAF, 2012; VEENEMA, 2012). Além disso, as disfunções sociais presentes em diversas psicopatologias estão envolvidas com alterações nos sistemas ocitocinérgico e vasopressinérgico (COCCARO et al., 1998; LUKAS & NEUMANN, 2013; NEUMANN & LANDGRAF, 2012; YRIGOLLEN et al., 2008). Ao analisarmos os resultados de hormônios em animais de diferentes idades, tais como a OT e a AVP, devemos levar em conta que, apesar de não terem sido encontradas diferenças entre os grupos nos níveis plasmáticos hormonais em alguns casos, é possível que sejam encontradas

diferenças em estruturas encefálicas – tais como no hipotálamo, amígdala e núcleo *accumbens* (ENGELMAN et al., 2004; LANDGRAF & NEUMANN, 2004; NEUMANN & LANDGRAF, 2012; ONAKA et al., 2012; STEVENS et al., 2013; VEENEMA, 2012; VEENEMA & NEUMANN, 2008).

Além dos níveis centrais desses neuropeptídeos, é igualmente importante a análise dos receptores de OT e AVP. O estudo de FRANCIS e colaboradores (2002) demonstrou que variações no cuidado maternal em ratos podem afetar a expressão de receptores ocitocinérgicos e vasopressinérgicos (subtipo V<sub>1A</sub>) da prole em estruturas envolvidas no comportamento social, tais como a amígdala. A investigação da expressão de receptores de OT e AVP em estruturas encefálicas do arganaz-do-campo (*Microtus ochrogaster*, uma espécie sociável e monogâmica de roedor) e no arganaz montanhês (*Microtus montanus*, uma espécie solitária e promíscua) ajudou a elucidar algumas bases neurobiológicas dos comportamentos sociais (LIM & YOUNG, 2006). Experimentos de separação maternal em ratos associam os prejuízos dos comportamentos sociais às alterações da ligação (*binding*) de OT e de AVP em seus receptores (OT-R e V<sub>1a</sub>-R, respectivamente) (LUKAS et al., 2010). Camundongos *knockout* para o receptor de OT apresentam déficits em comportamentos sociais (POBBE et al., 2012). Logo, futuras investigações poderiam revelar se ocorrem alterações não apenas nos níveis hormonais periféricos, como também nos níveis centrais e na expressão de seus receptores na prole submetida à intervenção neonatal de provocação social usada no presente trabalho, assim como fornecer maiores explicações para os efeitos comportamentais encontrados.

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que a provocação social, um modelo usado para estudar o comportamento agressivo de ratas lactantes em trabalhos anteriores (VEIGA et al., 2007, 2011a, 2011b), também pode ser considerado um modelo de intervenção neonatal, levando a modificações no comportamento maternal e na prole de forma precoce e

até duradoura, semelhante a outros modelos de intervenção perinatal. O ambiente precoce pode exercer uma grande influência no desenvolvimento de diversos parâmetros comportamentais e neuroendócrinos, tanto em roedores quanto em humanos (ARNOLD & SIVIY, 2002; LEHMANN & FELDON, 2000; MEERLO et al., 1999; RAINEKI et al., 2013; KAFFMAN & MEANEY, 2007). No entanto, diferente de outros modelos de intervenção neonatal, a provocação social em PP2 e PP5 aparentemente leva a efeitos mais específicos nos animais: ou seja, no que diz respeito aos comportamentos sociais em diferentes idades, assim como nas alterações hormonais subjacentes – conforme pode ser observado nos níveis plasmáticos de OT e AVP. Apesar de diferenças de protocolo de intervenção e de resultados em relação a outros estudos (CARINI & NEPHEW, 2013; CARINI et al., 2013; MURGATROYD & NEPHEW, 2013; NEPHEW & BRIDGES, 2011; ZULUAGA et al., 2013), o modelo utilizado neste trabalho também pode ser considerado como de um ambiente socialmente aversivo. Contudo, comparado com outros estudos, as alterações pontuais encontradas no presente estudo podem ser justificadas pela menor severidade do protocolo de intervenção neonatal utilizado.

A intervenção utilizada reduziu os comportamentos afiliativos em neonatos, reduziu os comportamentos agonísticos em juvenis (conforme observado na diminuição da brincadeira de luta), porém, aumentou os comportamentos agonísticos em adultos (conforme observado na diminuição da latência dos comportamentos agressivos). As alterações encontradas nos comportamentos sociais em três diferentes idades podem refletir mudanças adaptativas da prole – peculiares de cada idade – diante de um ambiente socialmente hostil e com maior competitividade (GEORGIEV et al., 2013; VEENEMA, 2009) mimetizado pela provocação social neonatal, refletindo o valor etológico da intervenção usada neste trabalho. O aumento na agressividade encontrado na prole adulta submetida a um ambiente socialmente hostil pode ser comparado com estudos em humanos (BEDI & GODDARD, 2007; CLEMENTS et al.,



2008; EDLESON 1999; ERNST et al., 2008; FANTUZZO & FUSCO, 2007; HERRENKOHL et al., 2008; HUMPHREYS, 2007; SPILSBURY et al., 2008). Ademais, pode ser sugerido que as alterações encontradas na prole tenham sido induzidas, indiretamente, pelas modificações no cuidado maternal. Logo, mais estudos são necessários para determinar se o protocolo usado neste trabalho – ou seja, a presença de machos provocadores e intrusos – também pode exercer uma influência direta sobre os filhotes.

O estudo do comportamento social e de suas bases neuroendócrinas em modelos animais é importante na compreensão dos aspectos básicos da sociobiologia tanto em humanos quanto nos demais animais. A investigação desse tema também pode contribuir para a compreensão de psicopatologias em humanos que afetam esses parâmetros, tais como o autismo, a ansiedade social, a depressão, a esquizofrenia e transtornos antissociais (CALCAGNOLI et al., 2013; COCCARO et al., 1998; COOKE & SHUKLA, 2011; LEE et al., 2007; LUKAS & NEUMANN, 2013; NEUMANN & LANDGRAF, 2012; READ et al., 2005; RUTTER et al., 2006; VANDERSCHUREN et al., 1997; YRIGOLLEN et al., 2008).

*Conclusões*

---

## 9. Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível elaborar as seguintes conclusões:

- A intervenção usada neste trabalho, o paradigma de provocação social, alterou o comportamento maternal de forma seletiva, aumentando a presença das ratas lactantes no ninho. Essa alteração comportamental das lactantes pode ser interpretada como proteção dos filhotes em um ambiente socialmente aversivo;
- Os comportamentos afiliativos em filhotes de ratos foram reduzidos pela intervenção. Os neonatos expostos à intervenção também apresentaram redução dos níveis plasmáticos de OT e PRL, porém, aumento nos níveis de AVP. Tais alterações hormonais podem ser relacionadas à alteração comportamental encontrada. Esses resultados podem ser decorrentes da alteração do vínculo mãe-filhote, em resposta a um ambiente socialmente aversivo causado pela intervenção;
- Os ratos juvenis expostos à intervenção no período neonatal apresentaram redução do comportamento de brincadeira, principalmente na supinação, a qual é considerada como brincadeira de luta. A intervenção também levou à redução dos níveis plasmáticos da AVP, sem afetar os outros hormônios. Tal alteração hormonal pode ser relacionada à alteração comportamental encontrada. O desenvolvimento alterado do comportamento social em juvenis pode ser decorrente do ambiente neonatal modificado pela intervenção experimental;
- Os animais adultos expostos à intervenção no período neonatal não apresentaram alterações na ansiedade e nas respostas hormonais ao estresse. Apesar da intervenção não ter influenciado os comportamentos afiliativos na vida adulta, foram afetados de forma

seletiva os comportamentos agonísticos – observado pelas latências reduzidas nos comportamentos agressivos. Entre os hormônios analisados em adultos, a intervenção alterou apenas a OT, conforme pode ser observado pela redução dos níveis plasmáticos basais. Tal alteração hormonal pode ser relacionada à alteração comportamental encontrada. Os efeitos seletivos encontrados em adultos submetidos à intervenção podem ser consequência da alteração específica observada no cuidado maternal recebido no período neonatal. Além disso, o aumento da agressividade pode ser visto como uma adaptação a um ambiente socialmente aversivo, conforme mimetizado pela intervenção neonatal;

- Foram encontradas diferenças entre machos e fêmeas nas idades juvenil e adulta conforme relatado na literatura. As ratas juvenis apresentaram redução dos comportamentos de brincadeira. As ratas adultas apresentaram redução na ansiedade e nos comportamentos sociais. A falta de diferenças hormonais entre os sexos – principalmente na vida adulta – pode ser devido ao fato que o ciclo estral não foi controlado;
- O paradigma de provocação social também pode ser considerado um modelo de intervenção neonatal, pois altera a relação mãe-filhote, assim como leva a alterações precoces e até duradouras na prole.

*Referências*

---

## 10. Referências

ARNOLD, J. L., Siviy, S. M. (2002). Effects of neonatal handling and maternal separation on rough-and-tumble play in rat. *Dev Psychobiol.*, 41: 205-215.

AGUGGIA, J. P., Suárez, M. M., Rivarola, M. A. (2013). Early maternal separation: neurobehavioral consequences in mother rats. *Behav Brain Res.*, 248: 25-31.

ALBERTS, J. R., Gubernick, D. J. (1983). Reciprocity and resource exchange: A symbiotic model of parent-offspring relations. In L. A. Rosenblum, H Moltz, *Symbiosis in parent-offspring relations* (pp. 7-44).

ALESSANDRI, S. M. (1992). Attention, play, and social behavior in ADHD preschoolers. *J. Abnorm. Child Psychol.*, 20: 289–302.

ALPER, R.H., Demarest, K.T., Moore, K.E. (1980). Morphine differentially alters synthesis and turnover of dopamine in central neuronal systems. *J Neural Transm.*, 48: 157-165.

ANDA, R.F., Felitti, V.J., Bremner, J.D., Walker, J.D., Whitfield, C., Perry, B.D., Dube Sh., R., Giles, W.H. (2006). The enduring effects of abuse and related adverse experiences in childhood: a convergence of evidence from neurobiology and epidemiology. *Eur. Arch. Psych. Clin. Neurosc.*, 256: 174-186.

ASAI, S., Ohta, R., Shirota, M., Watanabe, G., Taya, K. (2004). Differential responses of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis to acute restraint stress in Hatano high- and low-avoidance rats. *J Endocrinol.*, 181: 515-520.

AUGER, P. A., OLESEN, K. (2009). Brain sex differences and the organization of juvenile social play behavior. *J. Neuroendocrinol.*, 21: 519-525.

BÁNKY, Z., Nagy, G. M., Halász, B. (1994). Analysis of pituitary prolactina and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone,

but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. *Neuroendocrinol.*, 59: 63-71.

BARHA, C. K., Pawluski, J. L., Galea, L. A. (2007). Maternal care affects male and female offspring working memory and stress reactivity. *Physiol Behav.*, 92(5): 939-950.

BARBERIS, C., Tribollet, E. (1996). Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol.*, 10: 119-154.

BARTZ, J. A., Hollander, E. (2006). The neuroscience of affiliation: forging links between basic and clinical research on neuropeptides and social behavior. *Horm Behav.*, 50(4): 518-528.

BATTEN, S.V., Aslan, M., Maciejewsky, P.K., Mazure, C.M. (2004). Childhood maltreatment as a risk factor for adult cardiovascular disease and depression. *J. Clin. Psych.*, 65: 249-254.

BEANE, M. L., Cole, M. A., Spencer, R. L., Rudy, J. W. (2002). Neonatal Handling Enhances Contextual Fear Conditioning and Alters Corticosterone Stress Responses in Young Rats. *Horm Behav.*, 41(1): 33-40.

BEDI, G., Goddard, C. (2007). Intimate partner violence: What are the impacts on children? *Austr Psychol.*, 42: 66-77.

BERO L.A., Kuhn, C. (1987). Role of Serotonin in Opiate-Induced Prolactin Secretion and Antinociception in the Developing Rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 240: 831-836.

BERRIDGE, C.W., Waterhouse, B.D. (2003). The locus coeruleus– noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res. Rev.*, 42: 33–84.

BERTSCH, K., Schmidinger, I., Neumann, I. D., Herpertz, S. C. (2013). Reduced plasma oxytocin levels in female patients with borderline personality disorder. *Horm Behav.*, 63(3): 424-429.

BIELSKY, I. F., Young, L. J. (2004). Oxytocin, vasopressin and social recognition in mammals. *Peptides*, 25(9): 156-174.

BOLE-FEYSOT, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.*, 19: 225–268.

BONFIGLIO, J. J., Inda, C., Refojo, D., Holsboer, F., Artz, E., Silberstein, S. (2011). The Corticotropin-Releasing Hormone Network and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Molecular and Cellular Mechanisms Involved. *Neuroendocrinol.*, 94: 12-20.

BOSCH, O. J. (2011). Maternal nurturing is dependent on her innate anxiety: The behavioral roles of brain oxytocin and vasopressin. *Horm Behav.*, 59: 202-212.

BOSCH, O. J. (2013). Maternal aggression in rodents: brain oxytocin and vasopressin mediate pup defence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 368(1631): 20130085.

BOWLBY, J. (1958). The nature of the child's tie to his mother. *Int J Psychoanal.*, 39(5): 350–373

BOWLBY, J. (1969). *Attachment and loss: Vol. 1. Attachment.* New York: Basic Books.

BRAKE, W. G., Zhang, T. Y., Diorio, J., Meaney, M. J., Gratton, A. (2004). Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur. J. Neurosci.*, 19: 1863-1874.

BREDEWOLD, R., Smith, C. J. W., Dumais, K. M., Veenema, A. H. (2014). Sex-specific modulation of juvenile social play behavior by vasopressin and oxytocin depends on social context. *Front Behav Neurosci.*, 8: 216.

BRUNTON, P. J., Russel, J. A., Douglas, J. (2008). Adaptive Responses of the Maternal Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis during Pregnancy and Lactation. *J Neuroendocrinol.*, 20: 764-776.



CAIRNS, R. B. (1996). Aggression from a developmental perspective: genes, environments and interactions. *Ciba Found Symp.*, 194: 57-60.

CAIRNS, R. B., Gariépy, J. L., Hood, K. E. (1990). Development, microevolution, and social behavior. *Psychol Rev.*, 97: 49-65.

CALCAGNOLI, F., De Boer, S.G., Beiderbeck, D.I., Althaus, M., Koolhaas, J.M., Neumann, I.D. (2014). Local oxytocin expression and oxytocin receptor binding in the male rat brain is associated with aggressiveness. *Behav Brain Res.*, 261: 315-322.

CALCAGNOLI, F., De Boer, S.F., Althaus, M., Den Boer, J.A., Koolhaas, J.M. (2013). Antiaggressive activity of central oxytocin in male rats. *Psychopharmacology*, 229: 639-651.

CALDEIRA, J. C., Franci, C. R. (2000). Prolactin and corticosterone secretion in response to acute stress after paraventricular nucleus lesion by ibotenic acid. *Brain Res. Bull.*, 52: 483-489.

CAMERON, N. M., Champagne, F. A., Parent, C., Fish, E. W., Ozaki-Kuroda, K., Meaney, M. J. (2005). The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Neurosci. Biobehav Rev.*, 29: 843-865.

CARINI, M., Murgatroyd, C. A., Nephew, B. C. (2013). Using chronic social stress to model postpartum depression in lactating rodents. *J Vis Exp.*, 76: 50324.

CARINI, M., Nephew, B. C. (2013). Effects of early life social stress on endocrinology, maternal behavior, and lactation in rats. *Horm Behav.*, 64: 634-641.

CAROBREZ, A. P., BERTOGLIO, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.*, 29(8): 1193-1205.

CARRASCO, A.C., Van De Kar, L.D. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharm.*, 463: 235-272.

CARRIER, N., Kabbaj, M. (2012). Sex differences in social interaction behaviors in rats are mediated by extracellular signal-regulated kinase 2 expression in the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, 212: 86-92.

CARSON, D. S., Howerton, C. L., Garner, J. P., Hyde, S. A., Clark, C. L., Hardan, A. Y., Penn, A. A., Parker, K. J. (2014). Plasma vasopressin concentrations positively predict cerebrospinal fluid vasopressin concentrations in human neonates. *Peptides*, em publicação.

CARTER, C. S. (1998). Neuroendocrine perspectives on social attachment and love. *Psychoneuroendocrinology*, 23: 779-818.

CARTER, C. S. (2003). Developmental consequences of oxytocin. *Physiol Behav.*, 79: 383-397.

CARTER, C. S., Keverne, E. B. (2002). "The Neurobiology of Social Affiliation and Pair Bonding." Pp. 299–337 in *Hormones, Brain, and Behavior*. Ed. by Pfaff, D. V. I. NY: Academic Press.

CENTENARO, L. A., Zimmermann, N., Miczek, K. A., Lucion, A. B., De Almeida, R. M. M. (2008). Social instigation and aggressive behavior in mice: role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, 201: 237-48.

CHAMPAGNE, F. A., Chretien, P., Stevenson, C. W., Zhang, T. Y., Gratton, A., Meaney, M. J. (2004). Variations in nucleus accumbens dopamine associated with individual differences in maternal behavior in the rat. *J. Neurosci.*, 24: 4113–4123.

CHAMPAGNE, F. A., Curley, J. P. (2009). Epigenetic mechanisms mediating the long-term effects of maternal care on development. *Neurosc. Biobehav. Rev.*, 33: 593-600.

CHAMPAGNE, F. A., Francis, D. D., Mar, A., Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol. Behav.*, 79: 359-371.

CHEN, S.W., Shemyakin, A., Widenmayer, C.P. (2006). The Role of the Amygdala and Olfaction in Unconditioned Fear in Developing Rats. *J Neurosci.*, 26: 233-240.

CHENG, S.Y., Delville, Y. (2009). Vasopressin facilitates play fighting in juvenile golden hamsters. *Physiol Behav.*, 98: 242-246.

CHENG, S. Y., Taravosh-Lahn, K., Delville, Y. (2008). Neural circuitry of play fighting in golden hamsters. *Neuroscience*, 156(2): 247-256.

CHOLERIS, E., Kavalier, M., Pfaff, W. (2004). Functional genomics of social recognition. *J Neuroendocrinol.*, 16: 383-389.

CIRULLI, F., Berry, A., Alleva, E. (2003). Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev.*, 27: 73-82.

CLAPP, C., de la Escalera, G. M. (2011). Peripheral regulation of prolactin by oxytocin: focus on "Systemic oxytocin induces a prolactin secretory rhythm via the pelvic nerve in ovariectomized rats". *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301(3): R674-R675.

CLEMENTS, C. M., Oxtoby, C., Ogle, R. L. (2008). Methodological issues in assessing psychological adjustment in child witnesses of intimate partner violence. *Trauma, Violence, & Abuse*, 9: 114-127.

COCCARO, E. F., Kavoussi, R. J., Hauger, R. L., Cooper, T. B., Ferris, C. F. (1998). Cerebrospinal fluid vasopressin levels: correlates with aggression and serotonin function in personality-disordered subjects. *Arch. Gen. Psychiatry*, 55: 708-714.

COCHRAN, D. M., Fallon, D., Hill, M., Frazier, J. A. (2013). The role of oxytocin in psychiatric disorders: a review of biological and therapeutic research findings. *Harv Rev Psychiatry*, 21(5): 219-247.

CONNOR, T. J., Kelly, J. P., Leonard, B. E. (1997). Forced swim test-induced neurochemical, endocrine, and immune changes in the rat. *Pharm. Biochem. Behav.*, 58: 961-967.

CONSIGLIO, A.R. (2006). Depression Under the Perspective of Oxytocin. *C.N.S. Agents in Med. Chem.*, 6: 293-310.

CONSIGLIO, A. R., Bridges, R. S. (2009). Circulating prolactin, MPOA prolactin receptor expression and maternal aggression in lactating rats. *Behav Brain Res.*, 197: 97-102.

COOKE, B. M., Shuckla, D. (2011). Double Helix: Reciprocity between juvenile play and brain development. *Dev. Cog. Neurosci.*, 1: 459-470.

CORIA-AVILA, G. A., Manzo, J., Garcia, L. I., Carrillo, P., Miguel, M., Pfaus, J. G. (2014). Neurobiology of social attachments. *Neurosci Biobehav Rev.*, 43C: 173-182.

CRAWLEY, J. N., Chen, T., Puri, A., Washburn, R., Sullivan, T. L., Hill, J. M., Young, N. B., Nadler, J. J., Moy, S. S., Young, L. J., Caldwell, H. K., Young, W. S. (2007). Social approach behaviors in oxytocin knockout mice: comparison of two independent lines tested in different laboratory environments. *Neuropeptides*, 41(3): 145-163.

CROMWELL, H. C. (2011). Rat pup social motivation: A critical component of early psychological development. *Neurosci Biobehav Rev.*, 35: 1284-1290.

CUSHING B. S., Kramer, K. M. (2005). Mechanisms underlying epigenetic effects of early social experience: The role of neuropeptides and steroids. *Neurosci Biobehav Rev.*, 29: 1089-1105.

DALLA, C., Antoniou, K., Kokras, N., Drossopoulou, G., Papathanasiou, G., Bekris, S., Daskas, S., Papadopoulou-Daifoti, Z. (2008). Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission. *Physiol. Behav.*, 93: 595-605.

DALLMAN, M.F., Akana, S.F., Scribner, K.S., Pecoraro, N., La Fleur, S.E., Houshyar, H., Gomez, F. (2004). Chronic stress-induced effects of corticosterone on brain: direct and indirect. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1018:141-150.

DE ALMEIDA, R. M. M., Lucion, A. B. (1997). 8-OH-DPAT in the median raphé, dorsal periaqueductal gray and corticomедial amygdale nucleus decreases, but the medial septal area it can increase maternal aggressive behavior in rats. *Psychopharmacol.*, 134:392–400.

DE ALMEIDA, R. M. M., Miczek, K. A. (2001). Aggression escalated by social instigation or by discontinuation of reinforcement (“frustration”) in mice: Inhibition by anpirtoline: a 5-HT1B receptor agonist. *Neuropsychopharmacol.*, 27: 171-181.

DE AZEVEDO, M. S., de Souza, F. L., Donadio, M. V. F., Lucion, A. B., Giovenardi, M. (2010). Interventions in the neonatal environment in rats and their relationship to behavior in adulthood and maternal behavior. *Psychol Neurosci.*, 3(1): 73-78.

DE KLOET, E .R., Sibug, R. M., Helmerhorst, F. M., Schmidt, M. V. (2005). Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29: 271–281.

DELVILLE, Y., Newman, M. L., Wommack, J. C., Taravosh-Lahn, K., Cervantes, M. C. (2005). Em: Nelson R., editor. *Biology of aggression*. New York: Oxford University Press, p. 327-350.

DEMAREST, K.Y., Moore, K. E., Riegle, G. D. (1985). Acute restraint stress decreases Tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity: evidence for a differential response in male versus female rats. *Neuroendocrinol.*, 41: 504-511.

DENENBERG, V. H. (1999). Comentary: Is Maternal Stimulation the Mediator of Handling Effect in Infancy? *Dev. Psychobiol.*, 34: 1-3.

DE SOUZA, M. A., Centenaro, L. A., Menegotto, P. R., Henriques, T. P., Bonini, J., Achaval, M., Lucion, A. B. (2013). Prenatal stress produces social behavior deficits and alters the number of oxytocin and vasopressin neurons in adult rats. *Neurochem Res.*, 38: 1479-1489.

DE SOUZA, M.A., Szawka, R. E., Centenaro, L. A., Diehl, L. A., Lucion, A. B. (2012). Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. *Physiol Behav.*, 105: 850-855

DE VRIES, G. J., Buijs, R. M. (1983). The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum. *Brain Res.*, 273: 307-317.

DEYO, S. N., Swipt, R. M., Miller, R. J. (1979). Morphine and endorphine modulate dopamine turnover in rat median eminence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 3006-3009.

DIEHL, L. A., Henriques, T. P., Nunes, C. C., Lucion, A. B., Dalmaz, C. D. (2014). Maternal Separation alters social interaction and oxytocin levels in cerebrospinal fluid in rats. *Em preparação*.

DODGE, K. A., Bates, J. E., Pettit, G. S. (1990). Mechanisms in the cycle of violence. *Science*, 250(4988): 1678-1683.

DÖLLEN, G., Darvishzadeh, A., Huang, K. W., Malenka, R. C. (2013). Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature*, 501(7466): 179-784.

DONNER, N., Bredewold, R., Maloumy, R., Neumann, I. D. (2007). Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *Eur. J. NeuroSci.*, 25: 1804–1814.

DUBE, S.R., Felitti, V.J., Dong, M., Chapman, D.P., Giles, W.H., Anda, R.F. (2003). Childhood abuse, neglect, and household dysfunction and the risk of illicit drug use: the adverse childhood experiences study. *Pediatr.*, 111: 564-572.

EATON, M.J., Cheung, S., Moore, K. F., Lolingland, K. J. (1996). Dopamine receptor-mediated regulation of corticotrophin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.*, 738: 60-66.

EBENSPERGER, L. A. (1998). Strategies and counterstrategies to infanticide in mammals. *Biol Rev.*, 73: 321-346.

EDLESON, J. L. (1999). Children's Witnessing of Adult Domestic Violence. *Journal of Interpersonal Violence*, 14: 839-870.

ELENKOV, I. J., Chrousos, G. P. (2006). Stress System – Organization, Physiology and Immunoregulation. *Neuroimmunomodulation*, 13: 257-267.

EL-KHODOR, B. F., Edgar, N., Chen, A., Winberg, M. L., Joyce, C., Brunner, D., Suárez-Fariñas, M., Heyes, M. P. (2008). Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the SMNDelta7 neonate model of spinal muscular atrophy. *Exp Neurol.*, 212(1): 29-43.

ELLENBROEK, B. A., Derks, N., Park, H. J. (2005). Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. *Stress* 8(4): 247-257.

ELLIS, L. A., Mastro, A. M., Picciano, M. F. (1996). Milk-borne prolactin and neonatal development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1(3): 259-269.

ENERST, A. A., Weiss, S. J., Enright-Smith, S., Hansen, J. P. (2008). Positive outcomes from an immediate and ongoing intervention for child witnesses of intimate partner violence. *American Journal of Emergency Medicine*, 26: 389-394.

ENGELMANN, M., Landgraf, R., Wotjak, C. T. (2004). The hypothalamic-neurohypophyseal system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: An old concept revisited. *Front. Neuroendocrinol.*, 25: 132-149.

ERSKINE, M. S., Barfield, R. J., Goldman, B. D. (1978). Intraespecific fighting during late pregnancy and lactation in rats and effects of litter removal. *Behav Biol.*, 23: 206-218.

FARKAS, J., Reglodi, D., Gaszner, B., Szogyi, D., Horvath, G., Lubics, A., Tamas, A., Frank, F., Besirevic, D., Kiss, P. (2009). Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. *Brain Res Bull.*, 79(3-4): 208-214.

FERGUSON, J. N., Young, L. J., Insel, T. R. (2002). The neuroendocrine basis of social recognition. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 23: 200-224. 2002.

FERREIRA, A., Pereira, M., Agrati, D., Uriarte, N., Fernández-Guasti, A. (2002). Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiol Behav.*, 77: 197-204.

FERREIRA, A., Picazo, O., Uriarte, N., Pereira, M., Guasti-Fernández, A. (2000). Inhibitory effect of buspirone and diazepam, but not of 8-OH-DPAT, on maternal behavior and aggression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 66: 389-396.

FERRIS, C. F. (2005). Vasopressin/oxytocin and aggression. *Novartis Found. Symp.*, 268: 190-198.

FERRIS, C. F., Melloni, R. H. Jr., Koppel, G., Perry, K. W., Fuller, R. W., Delville, Y. (1997). Vasopressin/serotonin interactions in the anterior hypothalamus control aggressive behavior in golden hamsters. *J. Neurosci.*, 17: 4331-4340.

FILE S. E., Hyde, J. R. (1978). Can social interaction be used to measure anxiety? *Br. J Pharmacol.*, 62: 19-24.

FILE, S. E., Seth, P. (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol.*, 463(1-3): 35-53.

FISH, E. W., Faccidomo, S., Miczek, K. A. (1999). Aggression heightened by alcohol or social instigation in mice: reduction by the 5-HT1B receptor agonist CP-94,253. *Psychopharmacology*, 146: 391-399.

FLUGGE, G., van Kampen, M., Mijster, M. J. (2004). Perturbations in brain monoamine systems during stress. *Cell Tis Res.*, 315: 1-14.



FRANCIS, D. D., Champagne, F. C., Meaney, M. J. (2000). Variations in maternal behavior are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *J Neuroendocrinol.*, 12(12): 1145-1148.

FRANCIS, D. D., Young, L. J., Meaney, M. J., Insel, T. R. (2002). Naturally Occurring Differences in Maternal Care are Associated with the Expression of Oxytocin and Vasopressin (V1a) Receptors: Gender Differences. *J. Neuroendocr.*, 14: 349-353.

FREEMAN, M. E., Kanycska, B., Lerant, A., Nagy, G. P. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.*, 80: 1523-1631.

FRIES, A. B. W., Ziegler, T. E., Kurian, J. R., Jacoris, S., Pollak, S. D. (2005). Early experience in humans is associated with changes in neuropeptides critical for regulating social behavior. *PNAS*, 102: 17237-17240.

FRYE, C. A., Rhodes, M. E. (2008). Infusions of 3,5-THP to the VTA enhance exploratory, antianxiety, social, and sexual behavior and increase levels of 3,5-THP in midbrain, hippocampus, diencephalon, and cortex of female rats. *Behav Brain Res.*, 187: 88–99.

FANTUZZO, J., FUSCO, R. (2007). Children's direct exposure to types of domestic violence crime: A population-based investigation. *Journal of Family Violence*, 22: 543–552.

FUXE, K., Anderson, K., Eneroth, P., Siegel, R. A., Agnati, L. F. (1983). Immobilization stress-induced changes in discrete hypothalamic catecholamine levels and turnover, their modulation by nicotine and relationship to neuroendocrine function. *Acta Physiol. Scand.*, 117: 421-426.

GAMARO, G. D., Manoli, L. P., Torres, I. L. S., Silveira, R., Dalmaz, C. (2003). Effects of chronic variable stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem. Intern.*, 42: 107-114.

GARCIA, V. A., Dornelles, A. S., Presti-Torres, J., Alcalde, L.A., Halmenschlager, L.H., Schwartzmann, G., Roesler, R., Lucion, A. B., Schröder, N. (2010). Neonatal gastrin-

releasing peptide receptor blockade reduces maternal odor preference in rats. *Behav Brain Res.*, 214(2): 456-459.

GAROFLOS, E., Stamatakis, A., Rafrogianni, A., Pondiki, S., Stylianopoulou, F. (2008). Neonatal Handling on the First Postnatal Day Leads to Increased Maternal Behavior and Fos Levels in the Brain of the Newborn Rat. *Dev. Psychol.*, 50: 704-713.

GEORGIEV, A. V., Klimczuk, A. C. E., Traficonte, D. M., Maestripieri, D. (2013). When Violence Pays: A Cost-Benefit Analysis of Aggressive Behavior in Animals and Humans. *Evol Psychol.*, 11: 678-699.

GIMPL, G., Fahrenholz, F. (2001). The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. *Physiological Reviews*, 2: 629-683.

GIOVENARDI, M., Consiglio, A. R., Barros, H. M. T., Lucion, A. B. (2000). Pup age and aggressive behavior in lactating rats. *Braz. J. Méd. Res.*, 33: 1083-1088.

GOODWIN, R. D., Stein, M. B. (2004). Association between childhood trauma and physical disorders among adults in the United States. *Psychol. Med.*, 34: 509-520.

GORDON, I., Martin, C., Feldman, R., Leckman, J.F. (2011). Oxytocin and Social Motivation. *Dev Cogn Neurosci.*, 1: 471-493.

GOBROGGE, K. L., Liu, Y., Jia, X., Wang, Z. (2007). Anterior hypothalamic neural activation and neurochemical associations with aggression in pair-bonded male prairie voles. *J. Comp. Neurol.*, 502: 1109–1122.

GRAEFF, F. G., Viana, M. B., Mora, P. O. (1997). Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 21: 791–799.

GREEN, L., Fein, D., Modahl, C., Feinstein, C., Waterhouse, L., Morris, M. (2001). Oxytocin and autistic disorder: alterations in peptide forms. *Biol Psychiatry*, 50(8): 609-613.

GUBERNICK, D. J., Alberts, J. R. (1983). Maternal licking of young: Resource exchange and proximate controls. *Physiol. Behav.*, 31: 593-601.

GUDELSKY, G. A., Porter, J. C. (1979). Morphine- and opioide peptide-induced inhibition of the release of dopamine from Tuberoinfundibular neurons. *Life Sci.*, 25: 1697-1702.

GUDSNUK, K., Champagne, F. A. (2012). Epigenetic influence of stress and the social environment. *ILAR J.*, 53: 279-288.

HABIB, K. F., Gold, P. W., Chrousos, G. P. (2001). Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol. Met. Clin. North Am.*, 30: 695-728.

HAHN-HOLBROOK, J., Holt-Lunstad, J., Holbrook, C., Coyne, S. M., Lawson, E. T. (2011). Maternal Defense: Breast Feeding Increases Aggression by Reducing Stress. *Psychological Science*, 22: 1288-1295.

HARD, E., Engel, J., Musi, B. (1982). The ontogeny of defensive reactions in the rat: Influence of the monoamine transmission systems. *Scand J Psychol, Supplement*, 1: 90-96.

HARLOW, H. F., Dodsworth, R. O., Harlow, M. K. (1965). Total social isolation in monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA*, 54: 90-97.

HASHIMOTO, K., Murakami, K., Takao, T., Makino, S., Sugawara, M., Ota, Z. (1989). Effect of acute ether or restraint stress on plasma corticotropin-releasing hormone, vasopressin and oxytocin levels in the rat. *Acta Med Okayama*, 43(3): 161-167.

HEIM, C., Newport, D. J., Mletzko, T., Miller, A. H., Nemeroff, C. B. (2008). The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 33(6): 693-710.

HEINRICHS, M., Domes, G. (2008). Neuropeptides and social behaviour: effects of oxytocin and vasopressin in humans. In: *Progress in Brain Research*, cap. 28, 170: 337-350.

HENRIQUES, T.P., Szawka. R.E., Diehl. L.A., De Souza, M.A., Corrêa, C.N., Aranda, B.C.C., Sebben, V., Franci, C.R., Anselmo-Franci, J.A., Silveira, P.P., De Almeida, R.M.M. (2014). Stress in rat pups with different maternal care and monoaminergic and hormonal responses. *Neurochem Res.*, aceito para publicação.

HERMAN, J. P., McKlvenn, J. M., Solomon, M. B., Carvalho-Neto, E., Myers, B. (2012). Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Braz J Med Bio Res.*, 45: 292-298.

HERRENKOHL, T., SOUSA, C., TAJIMA, E., HERRENKOHL, R., MOYLAN, C. (2008). Intersection of child abuse and children's exposure to domestic violence. *Trauma, Violence & Abuse*, 9: 84-99.

HIGASHIDA, H., Shigeru, Y., Kikuchi, M., Munesue, T. (2012). CD38 and its role in oxytocin secretion and social behavior. *Horm Behav.*, 61: 351-358.

HOLT, T., Van den Berg, C. L., Van Ree, J. M., Spruijt, B. M. (1999). Isolation during the play period in infancy decreases adult social interactions in rats. *Behav Brain Res.*, 100(1-2): 91-97.

HOMBERG, J. R., Schieperso, J., Schoffelmeer, A. N., Cuppen, E., Vanderschuren, L. J. (2007). Acute and constitutive increases in central serotonin levels reduce social play behaviour in peri-adolescent rats. *Psychopharmacol (Berl.)*, 195(2):175-82.

HUMPHREYS, C. (2007). Domestic violence and child protection: Challenging directions for practice . Issues paper 13. Sydney: Australian Domestic & Family Violence Clearinghouse.

HUPPERTZ-KESSLER, C. J., Poeschl, J., Hertel, R., Unsicker, K., Schenckel, J. (2012). Effects of a new postnatal stress model on monoaminergic neurotransmitters in rat brains. *Brain Dev.*, 24: 274-279.

HYMAN, S. E., Malenka, R. C., Nestler, E. J. (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci.*, 29:565-98.

INSEL, T. R., Winslow, J. T. (1998). Serotonin and Neuropeptides in Affiliative Behaviors. *Biol. Psych.*, 44: 207-219.

INSEL, T. R., YOUNG, L. J. (2000). Neuropeptides and the evolution of social behavior. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 10: 784-789.

JEZOVÁ, D., Juránková, E., Mosnářová, A., Kriska, M., Skultéyová, I. (1996). Neuroendocrine response during stress with relation to gender differences. *Acta Neurobiol Exp.*, 56(3): 779-785.

JEZOVÁ, D., Skultéyová, I, Tokarev, D.I., Bakos, P., Vigas, M. (1995). Vasopresin and Oxytocin in Stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 771: 192-293.

JOHNSTON, A. L., File, S. E. (1991). Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol Behav.*, 49(2): 245-250.

JOCA, S. R. L., Ferreira, F. R., Guimarães, F. S. (2007). Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrenergic neurotransmitter systems. *Stress*, 10: 227-249.

JOELS, M., Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci.*, 10: 459-466.

JORDAN, R. (2003). Social play and autistic spectrum disorders: a perspective on theory, implications and educational approaches. *Autism*, 7: 347–360.

JORGENSEN, H. S. (2007). Studies on the neuroendocrine role of serotonin. *Dan. Med. Bull.*, 54: 266-288.

JORGENSEN, H., Knigge, U., Kjaer, A., Warberg, J. (2002). Serotonergic involvement in stress-induced vasopressin and oxytocin secretion. *Eur J Endocrinol.*, 147(6): 815-824.

KAFFMAN, A., Meaney, M. J. (2007). Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. *J Child Psychol Psychiatry*, 48(3-4): 224-44.

KARKOW, A. R. M., Lucion, A. B. (2013). Mild environmental intervention on the mother-infant interaction reduces play behavior in rats. *Psychol & Neurosci.*, 6: 39-44.

KEPECS, A., Uchida, N., Mainen, Z. F. (2006). The Sniff as a Unit of Olfactory Processing. *Chem. Senses*, 31: 167-179.

KITCHEN, I., Kelly, M., Turner, M. (1988). Dopamine receptor modulation of corticosterone secretion in neonatal and adult rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40: 580-581.

KOJIMA, S., Alberts, J. R. (2011). Warmth from Skin-to-Skin Contact with Mother is Essential for the Acquisition of Filial Huddling Preference in Prewearing Rats. *Dev Psychobiol.*, 53: 813-827.

KOJIMA, S., Stewart, R. A., Demast, G. E., Alberts, J. R. (2012). Maternal Contact Differentially Modulates Central and Peripheral Oxytocin in Rat Pups During a Brief Regime of Mother-Pup Interaction that Induces a Filial Huddling Preference. *J. Neuroendocrinol.*, 24: 831-840.

KOOB, G. F. (1999). Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biol. Psych.*, 46: 1167- 1180.

KOOLHAAS, J. M., Coppens, C. M., de Boer, S. F., Buwalda, B., Meerlo, P., Timmermans, P. J. A. (2013). The Resident-intruder Paradim: A Standardized Test for Agression, Violence and Social Stress. *J Vis Exp.*, 77: e4367.

KOOLHAAS, J. M., Everts, H., de Ruiter, A. J., de Boer, S. F., Bohus, B. (1998). Coping with stress in rats and mice: differential peptidergic modulation of the amygdala-lateral septum complex. *Prog. Brain Res.*, 119: 437-448.

KOSTEN, T. A., Zhang, X. Y., Kehoe, P. (2004). Infant rats with chronic neonatal isolation experience show decreased extracellular serotonin levels in ventral striatum at baseline and in response to cocaine. *Dev. Brain Res.*, 152: 19-24.

KRAEMER, G. W. (1992). A psychobiological theory of attachment. *Behav. Brain Sci.*, 15: 493-541.

KRISTAL, M. B. (2009). The biopsychology of maternal behavior in nonhuman mammals. *ILAR J.*, 50: 51-63.

KUHN, C. M., Paul, J., Schanberg, S. M. (1990). Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Dev. Psychobiol.*, 23: 395-410.

LAJUD, N., Roque, A., Cajero, M., Gutiérrez-Ospina, G., Torner, L. (2012). Periodic maternal separation decreases neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinol.*, 37: 410-420.

LANDGRAF, R. (1995). Intracerebrally released vasopressin and oxytocin: measurement, mechanisms and behavioural consequences. *J Neuroendocrinol.*, 7(4): 243-253.

LANDGRAF, R., Neumann, I. D. (2004). Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front Neuroendocrinol.*, 25(3-4): 150-176.

LAPLANTE, P., Diorio, J., Meaney, M. J. (2002). Serotonin regulates hippocampal glucocorticoid receptor via a 5-HT7 receptor. *Brain Res Dev Brain Res.*, 139:199-203.

LARSEN, C. M., Grattan, D. R. (2012). Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors. *Brain Behavior and Immunity*, 26(2): 201-209.

LAVIOLA, G., Terranova, M. L. (1998). The developmental psychobiology of behavioural plasticity in mice: the role of social experiences in the family unit. *Neurosci Biobehav Rev.*, 23: 197-213.

LAZZARI, V. M., Becker, R. O., de Azevedo, M. S., Morris, M., Rigatto, K., Almeida, S., Lucion, A. B., Giovenardi, M. (2013). Oxytocin modulates social interaction but is not essential for sexual behavior in male mice. *Behav Brain Res.*, 244: 130-136.

LEE, R., Brady, D. L., Shapiro, R. A., Dorsa, D. M., Koenig, J. I. (2007). Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Res.*, 1156:152-67

LEHMANN, J., Feldon, J. (2000). Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev. Neurosci.*, 11: 383–408.

LENG, G., Meddle, S. L., Douglas, A. J. (2008). Oxytocin and the maternal brain. *Curr. Op. Pharmacol.*, 8: 1-4.

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

LEON, M., Adels, L., Coopersmith, R., Woodside, B. (1984). Diurnal cycle of mother-young contact in Norway rats. *Physiol. Behav.*, 32: 999-1003.

LETOURNEAU, N. L., Fedick, C. B., Willms, J. D. (2007). Mothering and Domestic Violence: A Longitudinal Analysis. *J Fam Viol.*, 22: 649-659.

LETOURNEAU, N., Morris, C. Y., Steward, M., Hughes J., Critchley, K. (2013). Mothers and infants exposed to intimate partner violence compensate. *Violence Vict.*, 28: 571-586.

LEVENDOSKY, A. A., Lannert, B., Yalch, M. (2012). The effects of intimate partner violence on women and child survivors: an attachment perspective. *Psychodyn Psychiatry*, 40(3): 397-433.



- LEVINE, S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiol. Behav.*, 73: 255-260.
- LEVY, A. D., Van de Kar, L. D. (1992). Endocrine and receptor pharmacology of serotonergic anxiolytics, antipsychotics and antidepressants. *Life Sci.*, 51: 83-94.
- LIBERZON, I., Young, E. A. (1997). Effects of stress and glucocorticoids on CNS oxytocin receptor binding. *Psychoneuroendocr.*, 22: 411-422.
- LIGHTMAN, S. L., Windle, R. J., Julian, M. D., Harbuz, M. S., Shanks, N., Wood, S. A., Kershaw, Y. M., Ingram, C. D. (2000). Significance of pulsatility in the HPA axis. *Novartis Found Symp.*, 227: 244-257.
- LIM, M., Bielsky, I. F., Young, L. J. (2005). Neuropeptides and the social brain: potential rodent models of autism. *Int. J. Devl. Neuroscience*, 23: 235-243.
- LIM, M. M., Young, L. J. (2006). Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. *Horm Behav.*, 50(4): 506-517.
- LING, S., Jamali, F. (2003). Effect of cannulation surgery and restraint stress on the plasma corticosterone concentration in the rat: application of an improved corticosterone HPLC assay. *J Pharm Pharm Sci.*, 6(2): 246-251.
- LIU, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M., Meaney, M. J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277(5332): 1659-1662.
- LOEBER, R., Stouthamer-Loeber, M. (1998). Development of juvenile aggression and violence. Some common misconceptions and controversies. *Am Psychol.*, 53(2): 242-259.
- LOOKINGLAND, K. J., Gunnell, J. W., Toney, T. W., Moore, K. E. (1990). Comparison of the Effects of Ether and Restraint Stress on the Activity of Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons in Female and Male Rats. *Neuroendocrinol.*, 52: 99-105.

LONSTEIN, J. S. (2005). Resolving Apparent Contradictions Concerning the Relationships Among Fear or Anxiety and Aggression During Lactation: Theoretical Comment on D'Anna, Stevenson, and Gammie. *Behavioral Neuroscience*, 119: 1165–1168.

LONSTEIN, J. L., Gammie, S. C. (2002). Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26: 869-888.

LOWELL, A., Renk, K., Adgate, A. H. (2014) The role of attachment in the relationship between child maltreatment and later emotional and behavioral functioning. *Child Abuse Negl*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chiabu.2014.02.006>

LUCION, A. B., De Almeida, R. M. M., Da Silva, R. S. (1996). Territorial aggression, body weight, carbohydrate metabolism and testosterone levels of wild rats maintained in laboratory colonies. *Braz J Med Biol Res.*, 29: 1657-62.

LUKAS, M., Bredewold, R., Landgraf, R., Neuman, I. D., Veenema, A. H. (2011). Early life stress impairs social recognition due to a blunted response of vasopressin release within the septum of adult male rats. *Psychoneuroendocrinology*, 36: 843-853.

LUKAS, M., Bredewold, R., Neumann, I. D., Veenema, A. H. (2010). Maternal separation interferes with developmental changes in brain vasopressin and oxytocin receptor binding in male rats. *Neuropharmacology*, 58(1): 78-87.

LUKAS, M., Neuman, I. D. (2013). Oxytocin and vasopressin in rodent behaviors related to social dysfunctions in autism spectrum disorders. *Behavioural Brain Research*, 251: 85-94.

MAESTRIPIERI, D. (1992). Functional aspects of maternal aggression in mammals. *Canadian Journal of Zoology*, 70: 1069-1077.

MACRÌ, S., Chiarotti, F., Wüber, H. (2008). Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behav Brain Res.*, 191(2): 227-34.

MANASSIS, K., Bradley, S., Goldberg, S., Hood, J., Swinson, R.P. (1994). Attachment in mothers with anxiety disorders and their children. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, 33: 1106–1113.

MARCONDES, F. K., Miguel, K. J., Melo, L. L., Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav.*, 74: 435-440.

MARCUZZO, S., Dutra, M. F., Stigger, F., do Nascimento, P. S., Ilha, J., Kalil-Gaspar, P. I., Achaval, M. (2010). Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. *Brain Dev.*, 32(4): 323-331.

MASHOODH, R., Sinal, C. J., Perrot-Sinal, T. S. (2009). Predation threat exerts specific effects on rat maternal behaviour and anxiety-related behaviour of male and female offspring. *Physiol Behav.*, 96: 693-702.

MATTHEY, S., Barnett, B., Howie, P., Kavanagh, D. J. (2003). Diagnosing postpartum depression in mothers and fathers: whatever happened to anxiety? *J. Affect. Disord.*, 74: 139-147

McEWEN, B. S. (2002). Sex, stress and the hippocampus allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging*, 23: 921-939.

McCORMICK, C. M., Kehoe, P., Mallinson, K., Cecchi, L., Frye, C. A. (2002). Neonatal isolation alters stress hormone and mesolimbic dopamine release in juvenile rats. *Pharm. Biochem. Behav.*, 73: 77-85.

McLEOD, J., Sinal, C. J., Perrot-Sinal, T. S. (2007). Evidence for non-genomic transmission of ecological information via maternal behavior in female rats. *Genes Brain Behav.*, 6: 19-29.

MEANEY, M. J. (1988). The sexual differentiation of social play. *Trends Neurosci.*, 11(2): 54-58.

MEANEY, M. J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu. Rev. Neurosci.*, 24: 1161-92.

MEANEY, M. J., Diorio, J., Francis, D., Widdowson, J., LaPlante, P., Caldji, C., Sharma, S., Seckl, J.R., Plotsky, P.M. (1996). Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev. Neurosci.*, 18: 49–72.

MEANEY, M. J., Sapolsky, R. M., McEwen, B. S. (1985). The development of the Glucocorticoid Receptor System in the Rat Limbic Brain. I. Ontogeny and Autoregulation. *Dev. Brain Res.*, 18: 159-164.

MEERLO P., HORVATH, K. M., NAGY, G. M., BOHUS, B., KOOLHAAS, J. M. (1999). The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J Neuroendocrinol.*, 11(2): 925-933.

MENARD, J. L., Hakvoort, R. M. (2007). Variations of maternal care alter offspring levels of behavioural defensiveness in adulthood: Evidence for a threshold model. *Behav Brain Res.*, 176: 302-313.

MENNELLA, J. A., Moltz, H. (1988). Infanticide in rats: male strategy and female counter-strategy. *Physiol Behav.*, 42: 19-28.

MERCEDES PEREZ-RODRIGUEZ, M., Mahon, K., Russo, M., Ungar, A. K., Burdick, K. E. (2014). Oxytocin and social cognition in affective and psychotic disorders. *Eur Neuropsychopharmacol.*, em publicação.

MITCHELL, J. B., Rowe, W, Boksa, P, Meaney, M. J. (1990). Serotonin regulates type II corticosteroid receptor binding in hippocampal cell cultures. *J. Neurosci.*, 10: 1745-1752.

MILLER, D. B., O’Callaghan J. P. (2002). Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism.*, 51: 5-10.

MODAL, C., Green, L., Fein, D., Morris, M., Waterhouse, L., Feinstein, C., Levin, H. (1998). Plasma oxytocin levels in autistic children. *Biol Psychiatry*, 43(4): 270-277.

MOGI, K., Nagasawa, M., Kikusui, T. (2011). Developmental consequences and biological significance of mother-infant bonding. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35(5): 1232-41.

MOLES, A., Kieffer, B. L., D'Amato, F. R. (2004). Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Science*, 304: 1983-1986.

MOLLER, P. and Husby, R. (2000). The initial prodrome in schizophrenia: searching for naturalistic core dimensions of experience and behavior. *Schizophr. Bull.*, 26: 217–232.

MOORE, C. L. (1992). The role of maternal stimulation in the development of sexual behavior and its neural basis. *Ann N Y Acad Sci.*, 662: 160-177.

MOORE, C. L. (2007). Maternal behavior, infant development, and the question of developmental resources. *Dev Psychobiol.*, 49(1): 45-53.

MOORE, C. L., Chadwick-Dias, A. M. (1986). Behavioral responses of infant rats to maternal licking: Variations with age and sex. *Dev. Psychobiol.*, 19: 427-438.

MOORE, C. L., Morelli, G. (1979). Mother Rats Interact Differently with Male and Female Offspring. *J. Comp. Physiol. Psychobiol.*, 93: 677-684.

MORA, P. O., Netto, C. F., Graeff, F. G. (1997). Role of 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2B</sub> receptor subtypes in the two types of fear generated by the elevated T-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 58: 1051–1057.

MORICEAU, S., Roth, T. L., Okotoghaide, T., Sullivan, R. M. (2004). Corticosterone controls the developmental emergence of fear and amygdala function to predator odors in infant rat pups. *Int J Dev Neurosci.*, 22: 415-422.

MORICEAU, S., Shionoya, K., Jakubs, K., Sullivan, R.M. (2009). Early-Life Stress Disrupts Attachment Learning: The Role of Amygdala Corticosterone, Locus Ceruleus Corticotropin Releasing Hormone, and Olfactory Bulb Norepinephrine. *J Neurosci.*, 29: 15745-15755.

MORICEAU, S., Sullivan, R. M. (2005). Neurobiology of Infant Attachment. *Dev Psychobiol.*, 47: 230-242.

MORILAK., D. A., Barrera, G., Echevarria, D. J., Garcia., A. S., Hernandez, A., Ma, S., Petre., C. O. (2005). Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog. Neuro-Psychopharm. Biol. Psych.*, 29: 1214-1224.

MOURA, P. J., XAVIER, G. F. (2010). Memória de reconhecimento social em ratos. *Psicol. USP*, 21(2).

MURGATROYD, A. C., Nephew, B. C. (2013). Effects of early social stress on maternal behavior and neuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology*, 38: 219-28.

NAGASAWA, M., Okabe, S., Mogi, K., Kikusui, T. (2012). Oxytocin and mutual communication in mother-infant bonding. *Front Hum Neurosci.*, 6: 31.

NELSON, E., Panksepp, J. (1996). Oxytocin mediates acquisition of maternally associated odor preferences in preweanling rat pups. *Behav Neurosci.*, 110: 583–592.

NELSON, E., Panksepp, J. (1998). Brain substrates of infant mother attachment; contribution of opioids, oxytocin and norepinephrine. *Neurosci and Biobehav Rev.*, 22: 437- 452.

NEMSADZE, K., Silagava, M. (2010). Neuroendocrine foundation of maternal-child attachment. *Georgian Med News*, 189: 21-26.

NEPHEW, B.C., Bridges, R.S. (2011). Effects of chronic social stress during lactation of maternal behavior and growth in rats. *Stress*, 14: 677-684.

NEUMANN, I. D. (2003). Brain mechanisms underlying emotional alterations in the peripartum period in rats. *Depress Anxiety*, 17: 111-121.

NEUMANN, I. D. (2008). Brain Oxytocin: A Key Regulator of Emotional and Social Behaviors in Both Females and Males. *J. Neuroendocrinol.*, 20: 858-865.

NEUMANN, I. D., Landgraf, R. (2012). Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. *Trends in Neurosciences*, 35: 649-659.

NEUMANN, I. D., Toschi, N., Ohl, F., Torner, L., Kromer, S. A. (2001). Maternal defence as an emotional stressor in female rats: correlation of neuroendocrine and behavioral parameters and involvement of brain oxytocin. *Eur J Neurosci.*, 13: 1016-1024.

NEUMANN, I. D., Veenema, A. H., Beiderbeck, D. I. (2010). Aggression and anxiety: social context and neurobiological links. *Front Behav Neurosci.*, 4: 12.

NEUMANN, I. D., Wigger, A., torner, L., Holsboer, F., Ladgraf, R. (2000). Brain Oxytocin Inhibits Basal and Stress-Induced Activity of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis In Male and Female Rats: Partial Action Within the Paraventricular Nucleus. *J Neuroendocr.*, 12: 235-243.

NUMAN, M. (1988). Maternal Behavior. In: KNOBIL, E. & NEILL, J. *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York. p. 1569-1645.

NUMAN, M. (2006). Hypothalamic Neural Circuits Regulating Maternal Responsiveness Toward Infants. *Behav Cogn Neurosci Rev.*, 5(4): 163-190.

NUMAN, M., Insel, T. R. (2003). *The neurobiology of parental behavior*. New York: Springer-erlag.

NUMAN, M, Stolzenberg, D. S. (2009). Medial preoptic interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. *Front Neuroendocrinol.*, 30: 46-64.

ODYA, E. C., Sokoloff, G., Alberts, J. R. (2002). The effects of oxytocin on the aggregation of infant rats. *Society for Neurosci Abstr.*, 878.2.

ONAKA, T. (2004). Neural Pathways Controlling Central and Peripheral Oxytocin Release During Stress. *J. Neuroendocrinol.*, 16: 308-312.

ONAKA, T., Takayanagi, Y., Yoshida, M. (2012). Roles of Oxytocin Neurones in the Control of Stress, Energy Metabolism, and Social Behavior. *J. Neuroendocrinol.*, 24: 587-598.

PADOIN, M. J., Cadore, L. P., Gomes, C. M., Barros, H. M. T., Lucion, A. B. (2001). Long-Lasting Effects of Neonatal Stimulation on the Behavior of Rats. *Behav Neurosci.*, 115: 1332-1340.

PANKSEPP, J., Siviy, S., Normansell, L. (1984). The psychobiology of play: theoretical and methodological perspectives. *Neurosci Biobehav Rev.*, 8: 465-492.

PAPADIMITRIOU, A., Priftis, K. N. (2009). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation*, 16(5): 265-271.

PARENT, C. I., Del Corpo, A., Cameron, N. M., Meaney, M. J. (2013). Maternal care associates with play dominance rank among adult female rats. *Dev Psychobiol.*, 55(7): 745-756.

PARENT, C. I., Meaney, M. J. (2008). The influence of natural variations in maternal care on play fighting in the rat. *Dev Psychobiol.*, 50: 767-776.

PARENT, C., Zhang, T.-Y., Caldji, C., Bagot, R., Champagne, F. A., Pruessner, J., Meaney, M. J. (2005). Maternal care and individual differences in defensive responses. *Curr Dir Psychol Sci.*, 14: 229-233.

PARKER, S. L., Crowley, W. R. (1992). Activation of central D-1 dopamine receptors stimulates oxytocin release in the lactating rat: evidence for involvement of the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *Neuroendocrinology*, 56: 385-392.



PATCHEV, V. K., Schlosser, S. F., Hassa, A. H. S., Almeida, O. F. X. (1993). Oxytocin binding sites in rat limbic and hypothalamic structures: site-specific modulation by adrenal and gonadal steroids. *Neurosci.*, 57: 537-543.

PATIL, M. J., Henry, M. A., Akopian, A. N. (2014). Prolactin receptor in regulation of neural excitability and channels. *Channels (Austin)*, 8(3), em publicação.

PATIN, V., Lordi, B., Vincent, A., Caston, J. (2005). Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. *Developmental Brain Research.*, 160: 265-274.

PAUL, L., Kupferschmidt, J. (1975). Killing of conspecific and mouse young by male rats. *J Comp Physiol Psychol.*, 88: 755-763.

PAYNE, A. P., Andrews, M. J., Wilson, C. A. (1984). Housing, fighting and biogenic amines in the midbrain and hypothalamus of the golden hamster. In: Miczek KA (ed), *Ethopharmacological Aggression Research*. New York, Alan R. Liss.

PEDERSEN, A., Boccia, M. L. (2002). Oxytocin Links Mothering Received, Mothering Bestowed and Adult Stress Responses. *Stress*, 5(4): 259-267.

PELLIS, S. M. (2002). Sex Differences in Play Fighting Revisited: Traditional and Nontraditional Mechanisms of Sexual Differentiation in Rats. *Arch Sex Behav.*, 31: 17-26

PELLIS, S. M., Field, E. F., Smith, L. K., Pellis, V. C. (1997). Multiple Differences in the Play Fighting of Male and Female Rats. Implications for the Causes and Functions of Play. *Neurosci Biobehav Rev.*, 21(1): 105-120.

PELLIS, S. M., McKenna, M. (1995). What do rats find rewarding in play fighting? –an analysis using drug-induced non-playful partners. *Behav Brain Res.*, 68(1): 65-73.

PELLIS, S. M., Pellis, V. C. (1990). Differential rates of attack, defense, and counterattack during the developmental decrease in play fighting by male and female rats. *Dev Psychobiol.*, 23: 215-231.

PELLIS, S. M., Pellis, V. C. (1991). Attack and defense during play fighting appear to be motivationally independent behaviors in muroid rodents. *Psychol Rec.*, 41: 175-184.

PELLIS, S. M., Pellis, V. C. (1998). Play fighting of rats in comparative perspective: a schema for neurobehavioral analyses. *Neurosci Biobehav Rev.*, 23(1): 87-101.

PELLIS, S. M., Pellis, V. C. (2009). *The Playful Brain: Venturing to the Limits of Neuroscience*, Oneworld Publications.

PHILLIPS, N. K., Hammen, C. L., Brennan, P. A., Najman, J. M., Bor, W. (2005). Early adversity and the prospective prediction of depressive and anxiety disorders in adolescents. *J. Abnorm. Child Psychol.*, 33: 13–24.

PLETNIKOV, M. V.; RUBIN, S. A.; VASUDEVAN, K.; MORAN, T. H.; CARBONE, K. M. (1999). Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behav brain res.*, 100: 43–50.

POBBE, R. L., Pearson, B. L., Defensor, E. B., Bolivar, V. J., Young, W. S. 3rd, Lee, H. J., Blanchard, D. C., Blanchard, R.J. (2012). Oxytocin receptor knockout mice display deficits in the expression of autism-related behaviors. *Horm Behav.*, 61(3): 436-444.

POTEGAL, M. (1991). Attack priming and satiation in female golden hamsters: tests of some alternatives to the aggression arousal interpretation. *Aggressive Behavior*, 17: 327-335.

PRYCE, C. R., Bettschen, D., Feldon, J. (2001). Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Dev Psychobiol.*, 38: 239-251.

RAINEKI, C., Moriceau, S., Sullivan, R. M. (2010a). Developing a neurobehavioral animal model of infant attachment to an abusive caregiver. *Biol Psychiatry*, 67: 1137–1145.

RAINEKI, C., Pickenshagen, A., Roth, T.L., Babstock, D.M., McLean, J.H., Harley, C.W., Lucion, A.B., Sullivan, R.M. (2010b). The neurobiology of infant maternal odor learning. *Braz J Med Biol Res.*, 43: 914-919.

RAINEKI, C., De Souza, M. A., Szawka, R. E., Lutz, M. L., De Vasconcellos, L. F., Sanvitto, G. L., Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R., Cammarota, M., Lucion, A. B. (2009). 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. *Neurosci.* 159(1): 31-38.

RAINEKI, C., Lutz, M. L., Sebben, V., Ribeiro, R. A., Lucion, A. B. (2013). Neonatal handling induces deficits in infant mother preference and adult partner preference. *Dev Psychobiol.*, 55(5): 496-507.

RAZZOLI, M., Cushing, B. S., Carter, C. S., Valsecchi, P. 2003. Hormonal regulation of agonistic and affiliative behavior in female mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Horm Behav.*, 43(5): 549-553.

READ, J., van Os, J., Morrison, A. P., Ross, C. A. (2005). Childhood trauma, psychosis and schizophrenia: a literature review with theoretical and clinical implications. *Acta Psychiatr. Scand.*, 112: 330–350.

ROBERSON, R., Woodard, J. E., Toso, L., Abebe, D., Poggi, S. H., Spong, C. Y. (2006). Postnatal inflammatory model for cerebral palsy: too different from humans. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 195(4): 1038-1044.

RONCA, A. E., Alberts, J. R. (2000). Effects of prenatal spaceflight on vestibular responses in neonatal rats. *J Appl Physiol.* (1985), 89(6): 2318-2324.

ROSENBLATT, J. S. (1976). Stages in the early behavioural development of altricial young of selected species of non-primate mammals. In P. P. G. Bateson, R. A. Hinde, *Growing points in ethology* (pp. 345-383).

ROSENBLATT, J. S., Mayer, A. D., Giordano, A. L. (1988). Hormonal basis during pregnancy for the onset of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinol.*, 13: 29-46.

ROSENBLATT, J. S., Wagner, C. K., Morrel, J. I. (1994). Hormonal priming and triggering of maternal behavior in the rat with special reference to the relations between estrogen receptor binding and ER mRNA in specific brain regions. *Psychoneuroendocrinology*, 19: 543-52.

ROSS, H.E., Cole, C.D., Smith, Y., Neumann, I.D., Landgraf, R., Murphy, A.Z., Young, L. J. (2009). Characterization of the oxytocin system regulating affiliative behavior in female prairie voles. *Neuroscience*, 162: 892-903.

ROTH, T. L., Rainecki, C., Salstein, L., Perry, R., Sullivan-Wilson, T. A., Sloan, A., Lalji, B., Hammock, E., Wilson, D. A., Levitt, P., Okutani, F., Kaba, H., Sullivan, R. M. (2013). Neurobiology of secure infant attachment and attachment despite adversity: a mouse model. *Genes Brain Behav.*, 12(7): 673-680.

ROTH, T. L., Sullivan R. M. (2005). Memory of early maltreatment: Neonatal behavior and neural correlates of maternal maltreatment within the context of classical conditioning. *Biol Psychiatry*, 57: 823–831.

RUBIN, L. H., Carter, C. S., Bishop, J. R., Pournajafi-Nazarloo, H., Drogos, L. L., Hill, S. K., Ruocco, A. C., Keedy, S. K., Reilly, J. L., Keshavan, M. S., Pearlson, G. D., Tamminga, C. A., Gershon, E. S., Sweeney, J. A. (2014). Reduced Levels of Vasopressin and Reduced Behavioral Modulation of Oxytocin in Psychotic Disorders. *Schizophr Bull.*, em publicação.

RUTTER, M., Kim-Cohen, J., Maughan, B. (2006). Continuities and discontinuities in psychopathology between childhood and adult life. *J. Child Psychol. Psych.*, 47: 276–295.

SANCHEZ, M. M., Ladd, C. O., Plotsky, P. M. (2001). Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: Evidence from rodent and primate models. *Developmental Psychopathology*, 13: 419– 449.

SAPOLSKY, R. M., Romero, L.M., Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive suppressive stimulatory and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21: 55–89.

SCANTAMBURLO, G., Hansenne, M., Fuchs, S., Pitchot, W., Maréchal, P., Pequeux, C., Ansseau, M., Legros, J. J. (2007). Plasma oxytocin levels and anxiety in patients with major depression. *Psychoneuroendocrinology*, 32(4): 407-410.

SCHANK, J. C. (2009). Early locomotor and social effects in vasopressin deficient neonatal rats. *Behav Brain Res.*, 197: 166-177.

SCOTT, L. V., DINAN, T. G. (1998). Vasopressin and the regulation of hypothalamic–pituitary–adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sci.*, 62(22): 1985-1998.

SEVERINO, G. S., Fossati, I. A. M., Padoin, M. J., Gomes, C. M., Trevizan. L., Sanvitto, G. L., Franci, C. R., Anselmo-Franci, J. A., Lucion, A. B. (2004). Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiol Behav.*, 81: 489-498.

SHERIFF, M. J., Krebs, C. J., Boonstra, R. (2010). The ghosts of predators past: population cycles and the role of maternal programming under fluctuating predation risk. *Ecology*, 91: 2983-2994.

SILVEIRA, P. P., Portella, A. K., Assis, S. A., Nieto, F. B, Diehl, L. A, Crema, L. M., Peres W., Costa, G., Scorza, C., Quillfeldt, J. A, Lucion, A. B, Dalmaz, C. (2010). Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *Int J Dev Neurosci.*, 28(1):111-118.

SIVIY, S. M., Panksepp, J. (2011). In search of the neurobiological substrates of social playfulness in mammalian brains. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 35: 1821-1830.

SIVIY, S. M., Harrison, K. A. (2008). Effects of Neonatal Handling on Play Behavior and Fear Towards a Predator Odor in Juvenile Rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp. Physiol.*, 122: 1-18.

SLATTERY, D. A., Neumann, I. D. (2008). No stress please! Mechanisms of stress hyporesponsiveness of the maternal brain. *J Physiol.*, 586: 377-385.

SMITH, A. S., Wang, Z. (2012). Salubrious effects of oxytocin on social stress-induced deficits. *Horm. Behav.*, 61: 320-330.

SMYTHE, J. W., Rowe, W. B., Meaney, M. J. (1994). Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT<sub>2</sub> receptor binding in selected brain regions: relationship to the handling effect on glucocorticoid receptor expression. *Dev. Brain Res.*, 80: 183-189.

SPILSBURY, J. C., Kahana, S., Drotar, D., Creeden, R., Flannery, D. J., Friedman, S. (2008). Profiles of behavioural problems in children who witness domestic violence. *Violence and Victims*, 23: 3-17.

SPINKA, M., NEWBERRY, R. C., BEKOFF, M. (2001). Mammalian play: training for the unexpected. *Q. Rev. Biol.*, 76: 141-168

STACK, A., Carrier, N., Dietz, D., Hollis, F., Sorenson, J., Kabbaj, M. (2010). Sex Differences in Social Interaction in Rats: Role of the Immediate-Early Gene *zif268*. *Neuropsychopharmacology*, 35(2): 570-580.

STARR-PHILIPS, E. J., Beery, A. K. (2014). Natural Variation in Maternal Care Shapes Adult Social Behavior in Rats. *Dev Psychobiol.*, 56: 1017-1026

STEIN, D. J. (2009). Oxytocin and vasopressin: social neuropeptides. *CNS Spectr.*, 14(11): 602-606.

STEVENS, F. L., Weisman, O., Feldman, R., Hurley, R. A., Taber, K. H. (2013). Oxytocin and behavior: evidence for effects in the brain. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, 25(2): 96-102.

STRATAKIS, C. A., Chrousos, G. P. (1995). Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 771: 1– 18.

SUCHECKI, D., Nelson, D. Y., Van Oers, H., Levine, S. (1995). Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocr.*, 20: 169-182.

SULLIVAN, R. M., Dufresne, M. M. (2006). Mesocortical dopamine and HPA axis regulation: Role of laterality and early environment. *Brain Res.*, 1076: 49-59.

SULLIVAN, R. M., Wilson, D. A. (2003). Molecular Biology of Early Olfactory Memory. A Review. *Learning & Memory*, 10: 1-4.

SUOMI, S. J., Collins, M. L., Harlow, H. F. (1976). Effects of maternal and peer separations on young monkeys. *J Child Psychol Psychiatry*, 17: 101-112.

TAKAHASHI, L. K. (1992a). Developmental expression of defensive responses during exposure to conspecific adults in preweaning rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol.*, 106: 69-77.

TAKAHASHI, L. K. (1992b). Ontogeny of behavioral inhibition induced by unfamiliar adult male conspecifics in preweaning rats. *Physiol Behav.*, 52: 493-498.

TANAKA, K., OSAKO, Y., YURI, K. (2010). Juvenile social experience regulates central neuropeptides relevant to emotional and social behaviors. *Neuroscience*, 166(4): 1036-1042.

TARAZI, F. I., Tomasini, E. C., Baldessarini, R. J. (1999). Postnatal Development of Dopamine D1-Like Receptors in Rat Cortical and Striatolimbic Brain Regions: An Autoradiographic Study. *Dev. Neurosci.*, 21: 43-49.

TAYLOR, S. E., Klein, L. C., Lewis, B. P., Gruenewald, T. L., Gurung, R. A., Updegraff, J. A. (2000). Biobehavioral responses to stress in females: tend-and-befriend, not fight-or-flight. *Psychol Rev.*, 107(3): 411-429.

THOMPSON, M. R., Callaghan, P. D., Hunt, G. E., Cornish, J. L., McGregor, I. S. (2007). A role for oxytocin and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the prosocial effects of 3,4 METHYLENEDIOXYMETHAMPHETAMINE (ECSTASY). *Neurosci.*, 146: 509-514.

TILBROOK, A. J., Clarke, I. J. (2006). Neuroendocrine mechanisms of innate states of attenuated responsiveness of the hypothalamo-pituitary adrenal axis to stress. *Front. Neuroendocrinol.*, 27: 285-307.

TODESCHIN, A. S., Winkelmann-Duarte, E. C., Jacob, M. H. V., Aranda, B. C. C., Jacobs, S., Fernandes, M. C., Ribeiro, M. F. M., Sanvitto, G. L., Lucion, A. B. (2009). Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Horm Behav.*, 56: 93-100.

TORRES, I. L., Gamaro, G. D., Silveira-Cucco, S. N., Michalowski, M. B., Corrêa, J. B., Perry, M. L., Dalmaz, C. (2001). Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO<sub>2</sub> in hippocampal and cerebral cortex slices. *Braz J Med Biol Res.*, 34(1): 111-116.

TORNER, L., Toschi, N., Pohlinger, A., Landgraf, R., Neumann, I. D. (2001). Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J. Neurosci.*, 21: 3207–3214.

TREZZA, V., Baarendse, P. J. J., Vanderschuren, L. J. M. J. (2010). The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.*, 31: 463-469.

TREZZA, V., Damsteegt, R., Achterberg, E. J. M., Vanderschuren, L. J. M. J. (2011). Nucleus Accumbens u-Opioid Receptors Mediate Social Reward. *The J. Neurosc.*, 31: 6362-6370.

TSIGOS, C., Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.*, 53: 865-871.



TSUDA, M. C., Ogawa, S. (2012). Long-lasting consequences of neonatal maternal separation on social behaviors in ovariectomized female mice. *PLoS One*, 7(3): e33028.

URIARTE, N., Breigeiron, M. K., Benetti, F., Rosa, X. F., Lucion, A. B. (2007). Effects of Maternal Care on the Development, Emotionality, and Reproductive Functions in Male and Female Rats. *Develop. Psychobiol.*, 49: 451-462

UVNAS-MOBERG, K. (1998). Oxytocin mediate the benefits of positive social interactions and emotion. *Psychoneuroendocrinology*, 23: 819-835.

VAN ERP, A. M. M., Miczek, K. A. (2000). Aggressive behavior, increased accumbal dopamine and decreased cortical serotonin in rats. *J Neurosci.*, 15: 9320-9325.

VAN DEN BERG, C. L., Holt, T., Van Ree, J. M., Spruijt, B. M., Everts, H., Koolhaas, J. M. (1999). Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. *Dev. Psychobiol.*, 34: 129–138.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J., Niesink, R. J. M., Van Ree, J. M. (1997). The Neurobiology of Social Play Behavior in Rats. *Neurosci Biobehav Rev.*, 21: 309-326.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J., Stein, E. A., Wiegant, V. M., Van Ree, J. M. (1995a). Social isolation and social interaction alter regional brain opioid receptor binding in rats. *Eur. Neuropsychopharm.*, 5: 119-127.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J., Stein, E. A., Wiegant, V. M., Van Ree, J. M. (1995b). Social play alters regional brain opioid receptor binding in juvenile rats. *Brain Res.*, 680: 148-156.

VAN OERS, H. J. J., De Kloet, E. R., Li, C., Levine, S. (1998). The Ontogeny of Glucocorticoid Negative Feedback: Influence of Maternal Deprivation. *Endocr.*, 130: 2838-2846.

VARLINSKAYA, E. I., Spear, L. P. (2008). Social interactions in adolescent and adult Sprague-dawley male rats: Impact of social deprivation and test context familiarity. *Behav Brain Res.*, 188: 398-405.

VÁZQUEZ, D. M., Eskandari, R., Zimmer, C. A., Levine, S., López, J. F. (2002). Brain 5-HT receptor system in the stressed infant rat: implications for vulnerability to substance abuse. *Psychoneuroendocr.*, 27: 245-272.

VEENEMA, A. H. (2009). Early life stress, the development of aggression and neuroendocrine and neurobiological correlates: what can we learn from animal models? *Front Neuroendocrinol.*, 30: 497-518.

VEENEMA, A. H. (2012). Toward understanding how early-life experiences alter oxytocin- and vasopressin-regulated social behaviors. *Horm. Behav.*, 61: 304-312.

VEENEMA, A. H., Blume, A., Niederle, D., Buwalda, B., Neumann, I.D. (2006). Effects of early life stress on adult male aggression and hypothalamic vasopressin and serotonin. *Eur J Neurosci.*, 24: 1711-1720.

VEENEMA, A. H., Bredewold, R., De Vries, G. J. (2013). Sex-specific modulation of juvenile social play by vasopressin. *Psychoneuroendocrinology*, 38: 2554-2561.

VEENEMA, A. H., Neumann, I. D. (2009). Central vasopressin and oxytocin release: regulation of complex social behaviours. *Prog Brain Res.*, 170: 261-276.

VEENEMA, A. H., Neumann, I. D. (2009). Maternal separation enhances offensive play-fighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats. *Psychoneuroendocrinology*, 34: 463-467.

VEIGA, C. P., Aranda, B. C. C, Stein, D., Franci, C.R., Lucion, A. B., De Almeida, R. M. M. (2011a). Effect of social instigation and aggressive behavior on hormone levels of lactating dams and adult male Wistar rats. *Psychol & Neurosc.*, 4(1): 103-113.

VEIGA, C. P., Miczek, K. A., Lucion, A. B., De Almeida, R. M. M. (2011b). Social instigation and aggression in postpartum female rats: role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the dorsal raphe nucleus and prefrontal cortex. *Psychopharmacol.*, 213: 475-87.

VEIGA, C. P., Miczek, K.A., Lucion, A. B., De Almeida, R. M. M. (2007). Effect of 5-HT1B receptor agonists injected into the prefrontal cortex on maternal aggression in rats. *Braz J Med Biol Res.*, 40: 825-30.

VERMA, R., Balhara, Y. P. S., Gupta, C. S. (2011). Gender differences in stress response: Role of developmental and biological determinants. *Ind Psychiatry*, 20(1): 4-10.

VON FRIJTAG, J. C., Schot, M., van den Bos, R., Spruijt, B. M. (2002). Individual housing during the play period results in changed responses to and consequences of a psychosocial stress situation in rats. *Dev. Psychobiol.*, 41: 58–69.

WAKABAYASHI, I., Arimura, A., Schally, A. (1971). Effect of Pentobarbital and Ether Stress on Serum Prolactin Levels in Rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137: 1193-1198.

WALF, A. A., FRYE, C. A. (2007). The use of elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protocol.*, 2(2): 322-328.

WALKER, C. D., Deschamps, S., Proulx, K., Tu, M., Salzman, C., Woodside, B., Lupien, S., Gallo-Payet, N., Richard, D. (2004). Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. *Rev Psychiatr Neurosci.*, 29: 364-382.

WALKER, C. D., Scribner, K. A., Cascio, C. S., Dallman, M. F. (1991). The pituitary-adrenocortical system of neonatal rats is responsive to stress throughout development in a time-dependent and stressor-specific fashion. *Endocrinology*, 128(3): 1385-1395.

WANG, J., Taif, F., Yan, X., Yu, P. (2012). Paternal deprivation alters play-fighting, serum corticosterone and the expression of hypothalamic vasopressin and oxytocin in juvenile male mandarin voles. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.*, 198: 787-796.

WARD, I. L., Stehm, K. E. (1991). Prenatal stress feminizes juvenile play patterns in male rats. *Physiol Behav.*, 50(3): 601-605.

WENZEL, A., Haugen, E. N., Jackson, L. C., Robinson, K. (2003). Prevalence of generalized anxiety at eight weeks postpartum. *Arch. Women Ment. Health*, 6: 43-49.

WIEDENMAYER, C. P., Barr, G. A. (2001). Developmental changes in c-fos expression to an age-specific social stressor in infant rats. *Behav Brain Res.*, 126: 147-157.

WILKINS, A. S., Logan, M., Kehoe, P. (1997). Postnatal Pup Brain Dopamine Depletion Inhibits Maternal Behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 58: 867-873.

WILSON, E. O. (1975). *Sociobiology: a new synthesis*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

WINSLOW, J. T., CAMACHO, F. (1995). Cholinergic modulation of a decrement in social investigation following repeated contacts between mice. *Psychopharmacol (Berl)*, 121(2):164-72.

WINSLOW, J. T., Insel, T. R. (2002). The social deficits of the oxytocin knockout mouse. *Neuropeptides*, 36(2-3): 221-229.

WITT, D. M., Winslow, J. T., Insel, T. R. (1992). Enhanced social interactions in rats following chronic, centrally infused oxytocin. *Pharmacol Biochem Behav.*, 43(3):855-861.

YAU, J. L., Noble, J., Seckl, J. R. (1997). Site-specific regulation of corticosteroid and serotonin receptor subtype gene expression in the rat hippocampus following methylenedioxymethamphetamine: role of corticosterone and serotonin. *Neurosc.*, 78: 111-121.

YRIGOLLEN, C. M., Han, S. S., Kochetkova, A., Babitz, T., Chang, J. T., Volkmar, F. R., Leckman, J. F., Grigorenko, E. L. (2008). Genes controlling affiliative behavior as candidate genes for autism. *Biol Psychiatry*, 63(10): 911-916.

YOUNG, L. J. (1999). Oxytocin and vasopressin receptors and species-typical social behaviors. *Horm Behav.*, 36(3): 212-221.

YOUNG, L. J., Lim, M. M., Gingrich, B., Insel, T. R. (2001). Cellular mechanisms of social attachment. *Horm Behav.*, 40(2): 133-138.

YOUNG, L. J., Winslow, J. T., Wang, Z., Gingrich, B., Guo, Q., Matzuk, M. M., Insel, T. R. (1997). Gene targeting approaches to neuroendocrinology: oxytocin, maternal behavior, and affiliation. *Horm. Behav.*, 31: 221-231.

YOUNGSON, N. A., Whitelaw, E. (2008). Transgenerational epigenetic effects. *Annu Rev Genomics Hum Genet.*, 9: 233-257.

ZAR, J. H. (1996). *Biostatistical Analysis*. 3. ed. New Jersey: Prentice Hall Upper Saddle River.

ZIMMERBERG, B., Farley, M. J. (1993). Sex differences in anxiety behavior in rats: role of gonadal hormones. *Physiol Behav.*, 54(6): 1119-1124.

ZULUAGA, M. J., Agrati, D., Uriarte, N., Ferreira, A. (2013). Social Aversive Stimuli Presented to the Mother Produce the Precocious Expression of Fear in Rat Pups. *Dev Psychobiol.*, 56(6): 1187-1198.

*Anexos*

---

## ANEXO I

Planilhas para análise do comportamento maternal (Figura A) e para análise do comportamento de brincadeira (Figura B):

Lactante: _____		DA - amamentação em dorso bem arqueado										CN - Construção de ninho					MN - mãe no ninho (não amamentando)										
Dia do parto: _____		DP - amamentação em dorso pouco arqueado										OFF - mãe fora do ninho															
Grupo: _____		SUP - amamentação em supino										R - recolhida de filhote															
Data: _____		L - lambar filhote										FFF - filhote fora do ninho															
Dia PP: _____		DA/L - amamentação em dorso bem arqueado e lambendo																									
CLARO 1	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	DA	
																											DP
CLARO 2	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	SUP	
																											L
CLARO 3	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	DA/L	
																											MN
ESCURO 1	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	CN	
																											R
																											FFF
																											OFF

Figura A: Planilha de registro cumulativo do comportamento maternal (em PP3, PP4 e PP6).

COLÔNIA: _____		A - ataque										CH - cheirar														
Data do parto: _____		SUP - supinação																								
Grupo: _____		B - boxear																								
DATA: _____		SAL - saltitar																								
DIA PP: _____		P - perseguir																								
CLARO 1	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	A
ESCURO 1	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	B
ESCURO 2	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	P
ESCURO 3	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	

Figura B: Planilha de registro do comportamento de brincadeira em juvenis (PP30).

## ANEXO II

Carta de aprovação CEUA-UFRGS:

	<b>UFRGS</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	<b>PRÓ-REITORIA DE PESQUISA</b> Comissão De Ética No Uso De Animais	
<b>CARTA DE APROVAÇÃO</b>			
<b>Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:</b>			
<b>Número:</b> 21397			
<b>Título:</b> Provocação social em ratas lactantes - efeitos na ontogenia do comportamento social e das respostas ao estresse na prole			
<b>Pesquisadores:</b>			
<b>Equipe UFRGS:</b>			
ALDO BOLTEN LUCION - coordenador desde 03/01/2012			
THIAGO PEREIRA HENRIQUES - Aluno de Doutorado desde 03/01/2012			
<b><i>Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 100 ratas Wistar prenhas, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.</i></b>			
Porto Alegre, Quarta-Feira, 15 de Fevereiro de 2012			
			
_____ JOAO EDGAR SCHMIDT Pró-Reitor de Pesquisa			



## ANEXO III

Artigo submetido:

Developmental Psychobiology



Developmental Psychobiology

**Social Instigation in Lactating Dams Alters Mother-Infant Relationship and Hormonal Responses in Rat Pups**

Journal:	<i>Developmental Psychobiology</i>
Manuscript ID:	DEV-14-061
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	15-Jun-2014
Complete List of Authors:	Henriques, Thiaqo; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia Diehl, Luisa; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências Nunes, Cátia; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências Alves, Marcio; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências Stigger, Felipe; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências da Veiga, Caroline; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências de Souza, Marcelo; Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas Giovenardi, Márcia; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Departamento de Ciências Básicas da Saúde; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia Gomez, Rosane; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Farmacologia; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia
Keywords:	Mother-infant relations, Parental Care, Attachment, Hormones, Early Experience

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3 **Social Instigation in Lactating Dams Alters Mother-Infant Relationship and Hormonal**  
4  
5 **Responses in Rat Pups**  
6  
7

8  
9  
10 Thiago Pereira Henriques<sup>1</sup>, Luísa Amália Diehl<sup>2</sup>, Cátia Corrêa Nunes<sup>2</sup>, Márcio Bonesso  
11  
12 Alves<sup>2</sup>, Felipe de Souza Stigger<sup>2</sup>, Caroline Perinazzo da Veiga<sup>3</sup>, Marcelo Alves de Souza<sup>3</sup>,  
13  
14 Márcia Giovenardi<sup>1,4</sup>, Rosane Gomez<sup>1,5</sup>  
15

16  
17  
18 <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS),  
19  
20 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil  
21

22  
23 <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Neurociências, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
24

25  
26 <sup>3</sup>Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas (CCMF), Universidade Estadual do Oeste do  
27  
28 Paraná (UNIOESTE), Cascavel, Brasil

29  
30 <sup>4</sup>Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de  
31  
32 Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brasil

33  
34 <sup>5</sup>Departamento de Farmacologia, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
35  
36

37  
38 **Running title: Social Instigation and Mother-Infant Relationship**  
39  
40

41  
42  
43 Corresponding author:

44  
45 Thiago Pereira Henriques

46  
47 Rua Sarmiento Leite, 500/202

48  
49 90050-170 - Porto Alegre, RS, Brasil.

50  
51 Tel. +55-51-3308-3121; fax: +55-51-3308-3656.

52  
53 E-mail: henriques.tp@gmail.com  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**ABSTRACT**

The early postpartum days are critical for development in neonatal rats and stressful environment during this period may disrupt the stable reciprocal mother-infant relationship. We aimed to investigate the impact of social instigation paradigm (at postpartum days 2 and 5) on the maternal care (at postpartum days 3, 4, and 6) and on the nest odor preference test in pups (at postpartum day 7). Plasma oxytocin, arginine-vasopressin, prolactin, and corticosterone levels were also measured in pups. We found that social instigation increased the mother presence in the nest and decreased the nest odor preference in pups. Additionally, pups whose mothers were socially instigated showed lower oxytocin and prolactin, and higher arginine-vasopressin levels than control pups, without changes on corticosterone. Hence, we showed that social instigation disrupted the reciprocal mother-infant relationship, changing maternal behavior and attachment in pups. Hormonal changes in pups may have underlain alterations on affiliative behavior of pups.

**Keywords:** maternal care; neonatal intervention; early-life stress; aversive social environment; oxytocin; arginine-vasopressin; prolactin; corticosterone; *Rattus norvegicus*

## INTRODUCTION

Maternal care is widely present in mammals and is considered a critical influence for the development of their offspring (Champagne et al., 2003; Kristal, 2009). However, stressful interventions on early postpartum days may disrupt the stable reciprocal mother-infant relationship (Cirulli, Berry & Alleva, 2003; Pryce, Bettschen & Feldon, 2001). In rodents, neonatal handling, maternal separation, and social aversive stimuli during early postpartum days induce changes on maternal behaviors, such as licking/grooming pups, nursing postures, and nest building (Murgatroyd & Nephew, 2013; Pryce et al., 2001). Exposure of rat dams to an unfamiliar instigator or an intruder male increases maternal aggression during lactation (Giovenardi et al., 2000; Veiga et al., 2011). Moreover, lactating rats subjected to an instigator or aggressive confrontation with an intruder in the presence of their pups change prolactin (PRL), oxytocin (OT), and corticosterone (CORT) plasma levels, as well as decreased maternal care in rodents (Veiga et al., 2011). However, it was not investigated so far the consequences of the paradigm on their pups.

Nevertheless, perinatal interventions, such as prenatal stress and neonatal handling, can affect infant behavior, impairing preference for odors associated with the mother or nest in rat pups, and disrupting infant-mother attachment (de Souza et al., 2012; Rainecki et al., 2009, 2013). Additionally, interactions between mother and pups stimulate the release of endogenous OT in both of them (Carter, 2003; Lim & Young, 2006; Mogi, Nagasawa & Kikusui, 2011). This hormone has a key role in modulating maternal, attachment and social behaviors and, besides opioid system, is involved in motivation for seeking contact with their mothers, possibly acting through brain reward circuits (Cromwell, 2011; Nagasawa et al., 2012; Nelson & Panksepp, 1998). Similarly, arginine-vasopressin (AVP), a hormone involved in the regulation of social behaviors (Veenema, 2012) and PRL, a hormone involved on the regulation of maternal behavior, anxiety, stress, and trauma responses (Patil, Henry &

1  
2  
3 Akopian, 2014), have been associated with social deficits observed in autism spectrum  
4  
5 disorders (Fries, Ziegler & Kurian, 2005; Lukas & Neumann, 2013; Yrigollen et al., 2008).  
6  
7 Hence, the aim of the present work was to investigate the impact of social instigation  
8  
9 paradigm on mother-infant relationship, scoring cumulative maternal behavior in lactating  
10  
11 dams, the performance of 7-day-old pups on nest odor preference test, as well as hormonal  
12  
13 responses in pups.  
14  
15

## 16 17 18 **METHODS**

### 19 20 **Animals**

21  
22 Wistar male and female rats were obtained from the Animal Facility at the  
23  
24 Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Maternal behaviour was studied in 20 adult  
25  
26 lactating female rats. Additionally, 10 male adult (180-days-old) and 20 juvenile (35-days-  
27  
28 old) rats were used as instigators and intruders, respectively. That number of juvenile rats was  
29  
30 used to attenuate stress by reducing frequent exposure of the same intruder to maternal  
31  
32 aggression. All rats were kept in the laboratory breeding room on a 12:12 h light/dark cycle  
33  
34 (lights off at 6 pm), under a controlled environmental temperature ( $22 \pm 2$  °C) having free  
35  
36 access to water and chow (Nutrilab, Colombo, Brazil). On the day of birth, identified as Post-  
37  
38 Partum Day Zero (PPD0), 8 pups (4 males and 4 females) were kept with their mothers and  
39  
40 remained with them until PPD7, with no bedding changes or touching, except in the PPD1,  
41  
42 when part of the bedding was stored in tight-closed plastic bags and frozen at -80 °C for nest  
43  
44 odor preference test on PPD7. All experiments were performed in accordance with the NIH  
45  
46 guide for animal research and were approved by the Ethics Committee at UFRGS (CEUA-  
47  
48 UFRGS # 21397).  
49  
50  
51  
52

### 53 54 55 56 **Social Instigation Paradigm**

1  
2  
3 The social instigation paradigm was performed at PPD2 and PPD5 as described  
4 previously (Veiga et al., 2011). Briefly, lactating dams were observed in their resident home  
5 cages during the dark cycle. After 15 min of habituation to a red dim light, turned on to allow  
6 the observation by the experimenter, a social instigator male rat (180-days-old) was placed in  
7 the cage, inside a transparent perforated acrylic tube (10 cm diameter × 28 cm length) for 5  
8 min. After that, the tube was removed and 5 min later an intruder male rat (35-days-old) was  
9 placed on the corner of the cage, and the aggressive behaviors from resident female were  
10 observed for 10 min. Parallel to this socially instigated group (n = 10), the control group (n =  
11 10) was left undisturbed under the same experimental environment. Pups remained in the  
12 resident home cage, with their mother, during the entire experimental procedure (20 min).  
13 After the end of social instigation paradigm, the animals returned to the breeding room.  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

### 31 **Maternal Care**

32 Observation of maternal behaviors were carried out similarly to previous studies  
33 (Champagne et al., 2003; Henriques et al., 2014). Cumulative maternal behaviors were scored  
34 at PPD3, PPD4, and PPD6, taking from 3 sessions during the light phase (at 09:30 am, 12:30  
35 pm, and 3:30 pm) and 1 session during the dark phase (at 6:00 pm), under a red dim light.  
36 Frequencies of behaviors, such as presence in nest, nest building, nursing, licking/grooming  
37 pups, pups off nest, and pup retrieval, were registered punctually every 3 min, during 72 min  
38 (25 observations per session). More than one parameter could be registered at the same time.  
39 The sum from all observational days was considered to cumulative maternal behaviors score.  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

### 51 **Behavioral Analysis in Pups**

52 Nest odor preference test was performed at PPD7, during the light phase (starting at  
53 2:00 pm). Two pups (1 male and 1 female), from each lactating dam (control and socially  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 instigated), were individually placed on the middle of a small Plexiglas box ( $34 \times 40 \times 24$   
4 cm), on a neutral zone dark line (2 cm wide), facing to the target beddings. At the end of the  
5 box, on one of the corners, there was 300 mL of soiled nest bedding taken from PPD1. On the  
6  
7 opposite corner there was the same volume of fresh and clean bedding; both beddings were at  
8  
9 room temperature. In this two-odor choice protocol, pups performed 5 trials, lasting 1 min  
10  
11 each, followed by 2 min intervals. Nest and clean beddings were switched to the alternate  
12  
13 corner of the box between trials. The time spent by pups over the different areas was recorded  
14  
15 in each trial test. Pups were considered to be on an area when they turned their head or the  
16  
17 whole body to one of the two box sides, or when they crawled to one of the sides. The total  
18  
19 time spent by pups on each area represents the sum from the 5 trials. The time spent in  
20  
21 physical direct contact with nest bedding was also scored. During each trial, the testing box  
22  
23 was cleaned with 70% ethanol and carefully dried with a soft paper. The test was performed  
24  
25 as described in previous works (de Souza et al., 2012; Raineki et al., 2009, 2013).  
26  
27  
28  
29  
30  
31

32 To discard false negative results in the odor preference test, two remaining pups of  
33  
34 each litter (1 male and 1 female from control and from socially instigated groups) were tested  
35  
36 for motor skills according to Stigger et al., 2013. Firstly, they were placed in the center of a  
37  
38 circle (13 cm diameter) divided in 4 quadrants, latency to start locomotion, positive responses  
39  
40 and the number of crossings over the quadrants were recorded (open field). After, pups were  
41  
42 placed head down on a  $45^\circ$  inclined and it was measured the positive responses and latencies  
43  
44 to turn  $180^\circ$  and begin crawl up the slope (negative geotaxis test). Finally, pups were placed in  
45  
46 supine position, positive responses and latencies to return to prone position, with all 4 paws  
47  
48 on the ground, were measured (surface righting test). All time responses in each evaluation  
49  
50 were limited to a maximum of 60 s. Before performed the motor skills tests, pups were  
51  
52 weighted.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Hormonal Assessment in Pups

Immediately after the nest odor preference test, male and female pups from mothers that were socially instigated or from control mothers that were non-socially instigated were decapitated to collect trunk blood, which was centrifuged (10,000 RPM at 4 °C) for 10 min. Plasma was collected and stored at -80 °C for further ELISA analysis of prolactin (PRL) (SPI-Bio, Montigny Le Bretonneux, France), oxytocin (OT), arginine-vasopressin (AVP), and corticosterone (CORT) (all from Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) hormone plasma concentration.

### Statistical Analysis

Student's t-tests were performed to analyze maternal behaviors, considering social instigation as an independent variable. Two-way ANOVA tests were performed, considering sex and social instigation as independent variables, and behaviors from pups, as well as changes on hormonal concentration, as dependent variables. The two-way ANOVA was followed by the Tukey test to detect differences between groups. Non-parametric data were tested by the Kruskal-Wallis, followed by the Dun test. Parametric results were expressed as Means  $\pm$  Standard Error of the Means (SEM), while non-parametric ones were represented as Median  $\pm$  Interquartile Range (IR). Chi-Square and Fisher tests were also performed when appropriate (on percentage of positive responses of motor skills tests). The number (n) of animals per groups was given between parentheses in the legend of figures. Results were considered significant if  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Maternal and Pup Behaviors



1  
2  
3 Our results showed that the social instigation paradigm increased the frequency of dam  
4 presence in nest compared to non-socially instigated control lactating rats ( $t = 2.21$ ;  $df = 19$ ;  $P$   
5  $= 0.04$ ) (Table 1). In fact, this was the only maternal care behavior that was changed by social  
6 instigation.  
7  
8  
9  
10

11 We also showed that the nest odor preference was decreased in pups whose mothers  
12 were socially instigated compared to control pups ( $F_{(1,39)} = 6.78$ ;  $P = 0.01$ ) (Figure 1A).  
13 Kruskal-Wallis test showed that those pup rats showed a tendency to spend less time in  
14 physical contact with nest bedding compared to control pups (Figure 1B). No gender  
15 differences were observed on the nest odor preference test.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

23 Pups whose mothers were socially instigated did not present behavioral alterations on  
24 motor skills tests compared to control group ( $P > 0.05$ ). Latency to starting locomotion and  
25 number of crossings over the quadrants of the open field, as well as latencies on negative  
26 geotaxis, and surface righting behaviors, also did not change between male and female pups.  
27 Moreover, weight from pups whose mothers were socially instigated showed no difference  
28 ( $116.6 \pm 8.3$  g,  $n = 8$ ) than controls pups ( $124.2 \pm 4.0$  g,  $n = 8$ ), without gender differences ( $P$   
29  $= 0.15$ ).  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

#### 41 **Hormonal Responses in Pups**

42 At PPD7, pups whose mothers were socially instigated showed lower OT ( $F_{(1,19)} =$   
43  $5.38$ ,  $P = 0.03$ , Figure 2A) and PRL plasma levels ( $F_{(1,16)} = 5.83$ ,  $P = 0.03$ ; Figure 2C) than  
44 pups from control group. Interestingly, female rat pups showed lower OT levels than male  
45 pups ( $F_{(1,19)} = 4.51$ ;  $P = 0.05$ ; Figure 2A). Differently, AVP plasma levels were higher in male  
46 and female pups whose mothers were socially instigated than control pups ( $F_{(1,18)} = 4.30$ ,  $P =$   
47  $0.05$ ; Figure 2B). CORT, however, did not change in rat pups, independently of social  
48 instigation or gender (Figure 2D;  $P > 0.05$ ).  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## DISCUSSION

Early-life aversive environments may affect the behavioral and emotional development in mammals (Moriceau & Sullivan, 2005). Evidences point that alterations on maternal behavior, disrupting the mother-infant relationship, would be the main responsible for changes on brain plasticity and behaviors on adulthood (Cirulli et al, 2003; Pryce et al., 2001). The present work showed that the social instigation paradigm increased frequency of mother in the nest and decreased the nest odor preference in pups. Additionally, we showed that pups from socially instigated mothers decreased their basal OT and PRL plasma levels, as well as increased their AVP levels compared to controls.

Classically, social instigation protocol is used to investigate aggressive behavior in male and female rodents (Centenaro et al., 2008; Veiga et al., 2011). However, there are few studies concerning the effects social aversive stimuli on maternal behaviors (Nephew & Bridges, 2011; Veiga et al., 2011; Zuluaga et al., 2013). In our study, we showed that social instigation, promoted by non-familiar male rats in the resident cage, increased the frequency of dams in the nest, evidencing that this paradigm also alters maternal care in a cumulative way. Studies in humans also point that mothers exposed to domestic violence show compensatory increment of maternal behavior (Letourneau et al., 2013).

Other stressful interventions during the perinatal period also affect the maternal care. Neonatal handling, early deprivation, or social stress by unfamiliar adult males, increase pup licking/grooming and modify nursing posture behaviors in lactating dams (de Azevedo et al., 2010; Pryce et al., 2001; Zuluaga et al., 2013). However, postnatal chronic social stress, or prenatal restraint stress, decrease pup licking/grooming behavior in lactating dams (de Souza et al., 2012; Nephew & Bridges, 2011). In a previous study, we found a direct correlation between pup licking and frequency in the nest in high pup-licking dams (Henriques et al.,

1  
2  
3 2014). Differently, Zuluaga et al. (2013) showed an inverse correlation between pup licking  
4 and frequency in the nest when lactating dams were exposed to the presence of unfamiliar  
5 adult males for an extended period. Additionally, Veiga et al. (2011) showed that the total  
6 maternal behavior is significantly reduced during the social instigation paradigm, evidencing  
7 that this experiment disrupts the mother-pup interaction. Because lactating dams engage in  
8 investigative and aggressive behaviors towards the instigator or intruder males during the  
9 experiment they decrease pups care. Thus, compared to those studies, changes on specific  
10 maternal care behavior in the present work may be due to a difference in frequency and  
11 severity of the intervention protocol used, as well as the moment of maternal care observation.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

23 It is well established the importance of maternal care since it modulates the expression  
24 of behavioral and endocrine responses to stressful events in neonates, stimulating cognitive  
25 and emotional development, as well as transmission of relevant ecological information to the  
26 pup (Champagne et al., 2003; Cirulli et al., 2003; McLeod, Sinal & Perrot-Sinal, 2007). The  
27 participation of the infants in such relationship was also addressed in the present study.  
28 Infant-mother attachment is critical for survival and cues from mother such as odor or tactile  
29 stimuli are quickly learned by the offspring (Moriceau & Sullivan, 2005; Roth & Sullivan,  
30 2005). Indeed, because rodents open their eyes at about 14 days of age, odor learning is  
31 crucial to the development of approach responses, social behavior, and nipple attachment  
32 (Roth & Sullivan, 2005). In the first postnatal days of life, sensory stimuli increases the locus  
33 coeruleus activity, resulting on noradrenergic hyperactivity in the olfactory bulb and,  
34 consequently, odor learning, that enables neonates to approach the maternal odor (Moriceau  
35 & Sullivan, 2005; Rainecki et al., 2009). Interventions during the perinatal period, such as  
36 prenatal stress and neonatal handling, disrupt infant-mother attachment decreasing nest odor  
37 preference in rats (de Souza et al., 2012; Rainecki et al., 2013). Similarly, the social instigation  
38 paradigm used in the present work also decreased nest odor preference on PPD7 pups.  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Additionally, neuroendocrine systems play a key role on infant-mother interactions  
4 (Kojima & Alberts, 2011; Nelson & Panksepp, 1998; Lim & Young, 2006). We found that  
5 male and female pups, whose mothers were socially instigated, have lower OT and PRL  
6 plasma levels and higher AVP levels than control pups. It is known that maternal care, such as  
7 the presence and tactile stimuli from mothers increases OT concentrations in pup rats (Kojima  
8 et al., 2012; Mogi et al., 2011). Additionally, pups, which receive more licking/grooming  
9 bouts from the mother, increase OT plasma levels (Henriques et al., 2014; Mogi et al., 2011).  
10 Indeed, OT system is involved in motivation for seeking contact with the mother and OT  
11 antagonist decreases the filial preference for a maternally paired odor in pup rats (Cromwell,  
12 2011; Kojima & Alberts, 2011, Nelson & Panksepp, 1996). Moreover, OT knockout pup mice  
13 increase latency to crawl to the dam when they are separated from it (Lim & Young, 2006).  
14 Therefore, we suggest that pups submitted to the social instigation paradigm showed lower  
15 durations and contact with the nest bedding side than control pups due to reduced OT plasma  
16 levels. Although we did not find gender differences in the nest odor preference test, male  
17 showed higher OT levels than female pups. Because lactating rats naturally lick more male  
18 than female pups (Moore, 2007), we suppose that the higher plasma OT levels in our male  
19 pups are due to the increased licking/grooming received by their dams.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

41 Studies point that OT and PRL stimulate the release of each other (Clapp & de la  
42 Escalera, 2011) and PRL has additional effects beside milk production and maternal care  
43 (Larsen & Grattan, 2012) by acting on PRL receptors spread in the brain (Patil et al., 2014).  
44 Parallel to OT, here we found that the social instigation paradigm decreased PRL plasma  
45 levels in PPD7 pup rats, suggesting a reciprocal regulation from each other. Although there  
46 are no studies regarding the role of PRL on infant-mother attachment, we suggest that the  
47 impaired performance on nest odor preference test in our PPD7 pups is due to reduced PRL  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 plasma levels. Interesting, allelic variants of OT and PRL genes are associated with a lack  
4  
5 of affiliative behaviors in humans with autism spectrum disorders (Yrigollen et al., 2008).  
6

7  
8 Likewise, studies point that AVP also mediates affiliative behaviors, social cognition  
9  
10 and social approach in rodents (Veenema, 2012). However, OT and AVP show opposite  
11  
12 effects: while central OT exerts anxiolytic and antidepressant effects, AVP tends to show  
13  
14 anxiogenic and depressive actions (Neumann & Landgraf, 2012). Coincidentally, here we found  
15  
16 that pups, whose mothers were socially instigated, have higher AVP plasma levels than  
17  
18 control pups. Thus, AVP levels may also have underlain the affiliative deficits found in our  
19  
20 pups whose mothers were socially instigated, since a balanced activity of OT and AVP is  
21  
22 important for appropriate emotional behaviors (Neumann & Landgraf, 2012). Interestingly,  
23  
24 alterations on OT and AVP systems are also observed in subjects with affiliative and social  
25  
26 dysfunctions, such as in children raised in orphanages and in patients with autism spectrum  
27  
28 disorders (Fries et al., 2005; Lukas & Neumann, 2013). Although the first two weeks of  
29  
30 life is known to be a hyporesponsive period, in which pup rodents show reduced  
31  
32 neuroendocrine responses to stress (Levine, 2001), cold and maternal separation increase  
33  
34 CORT plasma levels in pups (Henriques et al., 2014; Kuhn, Paul & Schanberg, 1990; Yi &  
35  
36 Baram, 1994). Nevertheless, the ontogeny of neural, endocrine, and behavioral responses to  
37  
38 stress and fear in pups appears to be age- and stressor-specific (Walker et al., 1991;  
39  
40 Wiedenmayer & Barr, 2001). For instance, rat pups show inhibition of ultrasonic  
41  
42 vocalizations, and higher immobility, as well as increased ACTH secretion, and higher c-fos  
43  
44 expression in the amygdala when exposed to an unfamiliar adult male from PPD14, but not  
45  
46 before this age (Takahashi, 1992; Wiedenmayer & Barr, 2001). Here, at PPD7, we did not  
47  
48 show changes on plasma CORT in pups. Hence, we infer that the impaired performance on  
49  
50 nest odor preference test in our pups exposed to social instigation paradigm may be due to  
51  
52 changes on OT, AVP and PRL levels, but not to an aversive response to unfamiliar male rats.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 In conclusion, this study showed that social instigation paradigm, which has been  
4 classically used to study aggressive behavior in adult male and female rodents, may also be  
5 considered as a model of intervention on the neonatal environment, which interferes in the  
6 reciprocal mother-infant relationship. While dams increased the presence in nest, pups  
7 decreased the motivation for seeking contact with the mother. Changes on behaviors in our  
8 pups were underlined by increasing on OT and AVP, and decreasing on PRL plasma  
9 hormones, which play key roles on social and affiliative behaviors.  
10  
11

12  
13  
14  
15  
16  
17  
18 The study of the mother-infant relationship in animal models is relevant to better  
19 understanding the physiological basis of bonding and attachment in such reciprocal  
20 relationship. It is important to investigate the impact of social stressful environment, such as  
21 domestic violence, in both mothers and children to provide new insights for strategies to  
22 mental disorder treatments (Levendosky, Lannert & Yalch, 2012). Furthermore, research on  
23 the neuroendocrine basis of social behaviors in nonhuman animals are useful to unveil the  
24 mechanisms enrolled in affiliative and social dysfunctions, such as those found in children  
25 deprived of appropriate care-giving and in autism spectrum disorders.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**NOTES**

The authors are grateful for the financial support provided from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) and from Programa de Pós-Graduação em Fisiologia (UFRGS, Brazil).

**REFERENCES**

- Carter, C. S. (2003). Developmental consequences of oxytocin. *Physiology and Behavior*, 79, 383-397.
- Centenaro, L. A., Zimmermann, N., Miczek, K. A., Lucion, A. B., De Almeida, R. M. M. (2008). Social instigation and aggressive behavior in mice: role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, 201, 237-48.
- Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology and Behavior*, 79, 359-371.
- Cirulli, F., Berry, A., Alleva, E. (2003). Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27, 73-82.
- Clapp, C., de la Escalera, G. M. (2011). Peripheral regulation of prolactin by oxytocin: focus on "Systemic oxytocin induces a prolactin secretory rhythm via the pelvic nerve in ovariectomized rats". *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301(3): R674-R675.
- Cromwell, H. C. (2011). Rat pup social motivation: A critical component of early psychological development. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35, 1284-1290.

- 1  
2  
3 de Azevedo, M. S., de Souza, F. L., Donadio, M. V. F., Lucion, A. B., Giovanardi, M. (2010).  
4  
5 Interventions in the neonatal environment in rats and their relationship to behavior in  
6  
7 adulthood and maternal behavior. *Psychology and Neuroscience*, 3(1), 73-78.  
8  
9 de Souza, M. A., Szawka, R. E., Centenaro, L. A., Diehl, L. A., Lucion, A. B. (2012).  
10  
11 Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. *Physiology and*  
12  
13 *Behavior*, 105, 850-855.  
14  
15  
16 Fries, A. B. W., Ziegler, T. E., Kurian, J. R., Jacoris, S., Pollak, S. D. (2005). Early  
17  
18 experience in humans is associated with changes in neuropeptides critical for regulating  
19  
20 social behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*  
21  
22 *America*, 102, 17237-17240.  
23  
24  
25 Giovanardi, M., Consiglio, A. R., Barros, H. M. T., Lucion, A. B. (2000). Pup age and  
26  
27 aggressive behavior in lactating rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological*  
28  
29 *Research*, 33, 1083-1088.  
30  
31  
32 Henriques, T. P., Szawka, R. E., Diehl, L. A., De Souza, M. A., Corrêa, C. N., Aranda, B. C.  
33  
34 C., Sebben, V., Franci, C. R., Anselmo-Franci, J. A., Silveira, P. P., de Almeida, R. M.  
35  
36 M. (2014). Stress in neonatal rats with different maternal care backgrounds:  
37  
38 monoaminergic and hormonal responses. *Neurochemical Research*, submitted.  
39  
40  
41 Kojima, S., Alberts, J. R. (2011). Oxytocin mediates the acquisition of filial, odor-guided  
42  
43 huddling for maternally-associated odor in preweaning rats. *Hormones and Behavior*,  
44  
45 60(5), 549-558.  
46  
47  
48 Kojima, S., Stewart, R. A., Demast, G. E., Alberts, J. R. (2012). Maternal Contact  
49  
50 Differentially Modulates Central and Peripheral Oxytocin in Rat Pups During a Brief  
51  
52 Regime of Mother-Pup Interaction that Induces a Filial Huddling Preference. *Journal of*  
53  
54 *Neuroendocrinology*, 24, 831-840.  
55  
56  
57  
58  
59  
60



- 1  
2  
3 Kristal, M. B. (2009). The biopsychology of maternal behavior in nonhuman mammals. *ILAR*  
4 *journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 50, 51-  
5  
6 63.  
7  
8  
9  
10 Kuhn, C. M., Paul, J., Schanberg, S. M. (1990). Endocrine responses to mother-infant  
11  
12 separation in developing rats. *Developmental Psychobiology*, 23, 395-410.  
13  
14 Larsen, C. M., Grattan, D. R. (2012). Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors. *Brain*  
15  
16 *Behavior and Immunity*, 26(2): 201-209.  
17  
18 Letourneau, N., Morris, C. Y., Steward, M., Hughes J., Critchley, K. (2013). Mothers and  
19  
20 infants exposed to intimate partner violence compensate. *Violence and Victims*, 28, 571-  
21  
22 586.  
23  
24  
25 Levendosky, A. A., Lannert, B., Yalch, M. (2012). The effects of intimate partner violence on  
26  
27 women and child survivors: an attachment perspective. *Psychodynamic Psychiatry*, 40(3):  
28  
29 397-433.  
30  
31  
32 Levine, S. (2001). Primary social relationships influence the development of the  
33  
34 hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology and Behavior*, 73(3), 255 -260.  
35  
36  
37 Lim, M. M., Young, L. J. (2006). Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and  
38  
39 social bonding in animals. *Hormones and Behavior*, 50, 506-517.  
40  
41  
42 Lukas, M., Neuman, I. D. (2013). Oxytocin and vasopressin in rodent behaviors related to  
43  
44 social dysfunctions in autism spectrum disorders. *Behavioural Brain Research*, 251, 85-  
45  
46 94.  
47  
48  
49 McLeod, J., Sinal, C. J., Perrot-Sinal, T. S. (2007). Evidence for non-genomic transmission of  
50  
51 ecological information via maternal behavior in female rats. *Genes, Brain, and Behavior*,  
52  
53 6, 19-29.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 Mogi, K., Nagasawa, M., Kikusui, T. (2011). Developmental consequences and biological  
4  
5 significance of mother-infant bonding. *Progress in Neuropsychopharmacology and*  
6  
7 *Biological Psychiatry*, 35(5), 1232-1241.  
8  
9  
10 Moriceau, S., Sullivan, R. M. (2005). Neurobiology of Infant Attachment. *Developmental*  
11  
12 *Psychobiology*, 47, 230-242.  
13  
14 Moore, C. L. (2007). Maternal behavior, infant development, and the question of  
15  
16 developmental resources. *Developmental Psychobiology*, 49(1), 45-53.  
17  
18 Murgatroyd, A. C., Nephew, B. C. (2013). Effects of early social stress on maternal behavior  
19  
20 and neuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology*, 38, 219-228.  
21  
22 Nagasawa, M., Okabe, S., Mogi, K., Kikusui, T. (2012). Oxytocin and mutual communication  
23  
24 in mother-infant bonding. *Frontiers in Human Neuroscience*, 6, 31.  
25  
26 Nelson, E., Panksepp, J. (1998). Brain substrates of infant mother attachment; contribution of  
27  
28 opioids, oxytocin and norepinephrine. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22(3),  
29  
30 437- 452.  
31  
32 Nephew, B.C., Bridges, R.S. (2011). Effects of chronic social stress during lactation on  
33  
34 maternal behavior and growth in rats. *Stress*, 14, 677-684.  
35  
36 Neumann, I. D., Landgraf, R. (2012). Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications  
37  
38 for anxiety, depression, and social behaviors. *Trends in Neuroscience*, 35(11): 649-659.  
39  
40 Patil, M. J., Henry, M. A., Akopian, A. N. (2014). Prolactin receptor in regulation of neural  
41  
42 excitability and channels. *Channels (Austin)*, 8(3), ahead of print.  
43  
44 Pryce, C. R., Bettschen, D., Feldon, J. (2001). Comparison of the effects of early handling and  
45  
46 early deprivation on maternal care in the rat. *Developmental Psychobiology*, 38, 239-251.  
47  
48 Rainecki, C., De Souza, M. A., Szawka, R. E., Lutz, M. L, De Vasconcellos, L. F., Sanvitto, G.  
49  
50 L., Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R., Cammarota, M., Lucion, A. B. (2009). Neonatal  
51  
52 handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb.  
4  
5 Neuroscience, 159(1), 31-38.  
6  
7 Rainecki, C., Lutz, M. L., Sebben, V., Ribeiro, R. A., Lucion, A. B. (2013). Neonatal handling  
8 induces deficits in infant mother preference and adult partner preference. *Developmental*  
9 *Psychobiology*, 55(5), 496-507.  
10  
11  
12 Roth T. L., Sullivan R. M. (2005). Memory of early maltreatment: Neonatal behavior and  
13 neural correlates of maternal maltreatment within the context of classical conditioning.  
14 *Biological Psychiatry*, 57, 823-831.  
15  
16 Stigger, F., Lovatel, G., Marques, M., Bertoldi, K., Moysés, F., Elsner, V., Siqueira, I. R.,  
17 Achaval, M., Marcuzzo, S. (2013). Inflammatory response and oxidative stress in  
18 developing rat brain and its consequences on motor behavior following maternal  
19 administration of LPS and perinatal anoxia. *International Journal of Developmental*  
20 *Neuroscience*, 31(8), 820-827.  
21  
22 Takahashi, L. K. (1992). Ontogeny of behavioral inhibition induced by unfamiliar adult male  
23 conspecifics in preweanling rats. *Physiology and Behavior*, 52, 493-498.  
24  
25 Veenema, A. H. (2012). Toward understanding how early-life experiences alter oxytocin- and  
26 vasopressin-regulated social behaviors. *Hormones and Behavior*, 61, 304-312.  
27  
28 Veiga, C. P., Aranda, B. C. C., Stein, D., Franci, C. R., Lucion, A. B., de Almeida, R. M. M.  
29 (2011). Effect of social instigation and aggressive behavior on hormone levels of  
30 lactating dams and adult male Wistar rats. *Psychology and Neuroscience*, 4(1), 103-113.  
31  
32 Walker, C. D., Deschamps, S., Proulx, K., Tu, M., Salzman, C., Woodside, B., Lupien, S.,  
33 Gallo-Payet, N., Richard, D. (2004). Mother to infant or infant to mother? Reciprocal  
34 regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. *Journal*  
35 *of Psychiatry and Neuroscience*, 29, 364-382.  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

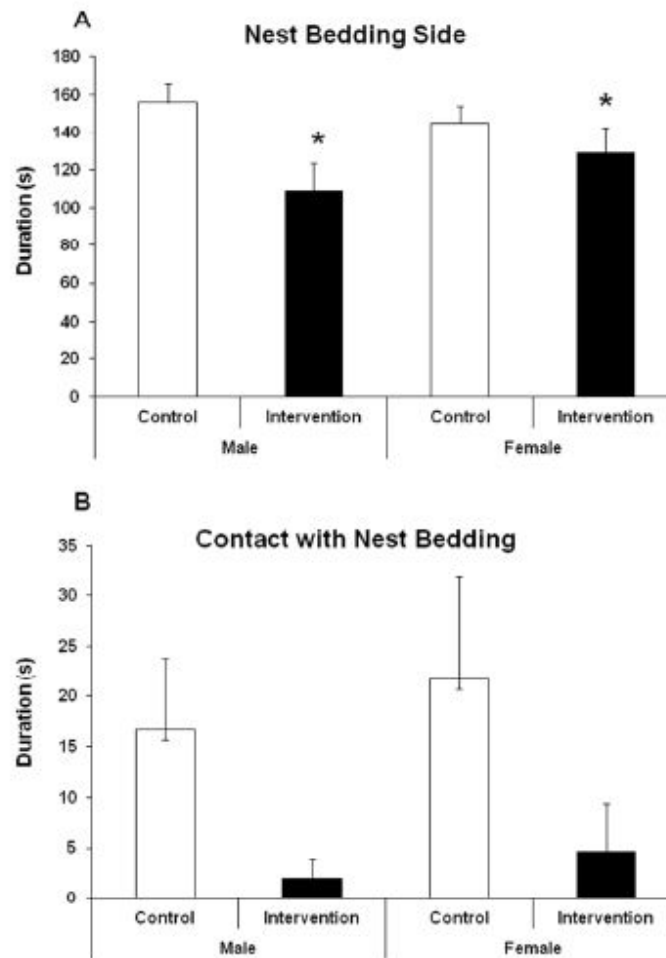
- 1  
2  
3 Walker, C. D., Scribner, K. A., Cascio, C. S., Dallman, M. F. (1991). The pituitary-  
4  
5 adrenocortical system of neonatal rats in responsive to stress throughout development in a  
6  
7 time-dependent and stressor-specific fashion. *Endocrinology*, 128(3): 1385-1395.  
8  
9  
10 Wiedenmayer, C. P., Barr, G. A. (2001). Developmental changes in c-fos expression to an  
11  
12 age-specific social stressor in infant rats. *Behavioural Brain Research*, 126, 147-157.  
13  
14 Yi, S. J., Baram, T. Z. (1994) Corticotropin-releasing hormone mediates the response to cold  
15  
16 stress in the neonatal rat without compensatory enhancement of the peptide's gene  
17  
18 expression. *Endocrinology* 135(6), 2364-2368.  
19  
20 Yrigollen, C. M., Han, S. S., Kochetkova, A., Babitz, T., Chang, J. T., Volkmar, F. R.,  
21  
22 Leckman, J. F., Grigorenko, E. L. (2008). Genes controlling affiliative behavior as  
23  
24 candidate genes for autism. *Biological Psychiatry*, 63(10), 911-916.  
25  
26  
27 Zuluaga, M. J., Agrati, D., Uriarte, N., Ferreira, A. (2013). Social Aversive Stimuli Presented  
28  
29 to the Mother Produce the Precocious Expression of Fear in Rat Pups. *Developmental*  
30  
31 *Psychobiology*, ahead of print.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Table 1. Cumulative frequencies of maternal behaviors at Post-Partum Days 3, 4 and 6 in Control and in socially instigated dams (Intervention). Student's t-tests were performed to compare the groups.

Maternal Behavior	Control n=10	Intervention n=10	<i>P</i>
Presence in nest	175 ± 15.51	241 ± 7.06	0.04*
Licking	7.27 ± 1.44	9 ± 1.23	0.38
High crouch nursing	97.27 ± 11.41	112.10 ± 9.72	0.34
High crouch nursing and Licking	6.54 ± 0.57	5.40 ± 0.90	0.29
Total nursing	135.40 ± 14.68	161.30 ± 8.41	0.15
Nest building	16.82 ± 3.59	13.20 ± 2.41	0.42
Pup off nest	9 ± 1.83	12.30 ± 3.57	0.40

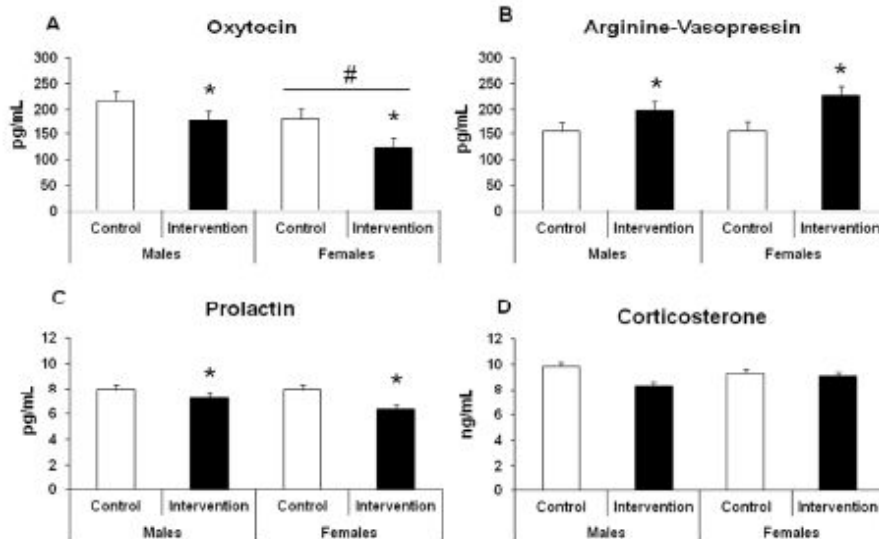
Data are expressed as Mean ± S.E.M. \* Different from control groups.

FIGURE 1



Nest Odor Preference Test in 7-day-old control or intervention pup rats. Intervention group refers to those pups whose mothers were socially instigated (Intervention) at PPD 2 and 5. (A) Time spent in nest bedding site,  $n = 10/\text{group}$ , two-way ANOVA test; \*  $P = 0.01$  and (B) Time spent in direct contact with nest bedding,  $n = 10/\text{group}$ , Kruskal-Wallis,  $P = 0.058$ .  
190x275mm (96 x 96 DPI)

FIGURE 2



Plasma oxytocin (OT) (A); arginine-vasopressin (AVP) (B); prolactin (PRL) (C); and corticosterone (CORT) (D) levels in PPD7 rats.  $n = 10/\text{group}$ ; two-way ANOVA test + Tukey test. \* Different from Control Group,  $P = 0.03$ ; # Different from male pup rats,  $P = 0.05$ .  
275x190mm (96 x 96 DPI)