



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

*EFEITOS DO ESTRESSE PERINATAL SOBRE A RELAÇÃO MÃE-
FILHOTE DE RATAS*

Charles Francisco Ferreira

Porto Alegre/RS

2010



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

*EFEITOS DO ESTRESSE PERINATAL SOBRE A RELAÇÃO MÃE-
FILHOTE DE RATAS*

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

Mestrando: Charles Francisco Ferreira
Orientador: Dr. Aldo Bolten Lucion
Co-Orientadora: Dra. Annabel Ferreira

Porto Alegre

2010

A Maria C. R. Fermino, pelo cuidado maternal fornecido.

"Escolho meus amigos não pela pele ou outro arquétipo qualquer, mas pela pupila. Tem que ter brilho questionador e tonalidade inquietante. A mim não interessam os bons de espírito nem os maus de hábitos. Fico com aqueles que fazem de mim louco e santo. Deles não quero resposta, quero meu avesso. Que me tragam dúvidas e angústias e agüentem o que há de pior em mim. Para isso, só sendo louco. Quero-os santos, para que não duvidem das diferenças e peçam perdão pelas injustiças. Escolho meus amigos pela cara lavada e pela alma exposta. Não quero só o ombro ou o colo, quero também sua maior alegria. Amigo que não ri junto não sabe sofrer junto. Meus amigos são todos assim: metade bobeira, metade seriedade. Não quero risos previsíveis nem choros piedosos. Quero amigos sérios, daqueles que fazem da realidade sua fonte de aprendizagem, mas lutam para que a fantasia não desapareça. Não quero amigos adultos nem chatos. Quero-os metade infância e outra metade velhice. Crianças, para que não esqueçam o valor do vento no rosto e velhos, para que nunca tenham pressa. Tenho amigos para saber quem eu sou. Pois os vendo loucos e santos, bobos e sérios, crianças e velhos, nunca me esquecerei de que normalidade é uma ilusão imbecil e estéril."

Oscar Wilde

(16/10/1854 – 30/09/1900)

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço aos meus anjos protetores por estarem comigo em todos os momentos da minha vida, me orientando, por pensamentos e incentivos de coragem quando a distância e o tempo não nos permitiam estar juntos. Vocês – Maria Cléto Rafael Fermino, Benedito Fermino, Angela, Graça, Carmem, Antonieta, Maria, Paulo, Pedro, João, César e Marcos – são os responsáveis por eu estar aqui. Obrigado por todo carinho e apoio nos momentos que julguei mais difíceis. Isto é por nós! Se hoje sou o que sou, sou graças a vocês.

A todos os meus familiares – sobrinhos, sobrinhas, tios, tias, cunhados e cunhadas – por toda a ajuda que me forneceram durante mais uma etapa de minha vida.

Ao Professor Aldo Lucion, muito obrigado pela oportunidade! Por toda a paciência, dedicação e conhecimento gerado durante a realização deste trabalho.

À Professora Annabel Ferreira pela co-orientação. Sempre disposta a esclarecer dúvidas e a sugerir soluções, mesmo a longa distância. Pela perspicácia na discussão de aspectos relevantes no planejamento e execução deste trabalho, pelo exemplo de profissional consciente em que me espelho

cada vez mais; pelo companheirismo em todas as horas e pela convivência agradável que temos tido.

Ao Professor Gilberto Luiz Sanvitto por todo o auxílio e explicações prestados para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, minha segunda família. Sempre presentes para comemorar as boas conquistas e também para confortar nos momentos de angústia. Para jamais me fazer esquecer o verdadeiro valor que cada coisa tem. Márcio M. Machiori, Débora P. Rico, Tiago M. A. Ferrari, Juliana P. Lima, Gabriel Dall Agnol, Gabriela Soares, Cléo, Clodis Boscarioli e Derby Nery Neto.

Como consta em Eclesiástico, capítulo 6, versículo 14 “... Quem encontrou um amigo, encontrou um tesouro...”. Para vocês: Suelen, Silvana Jacobs, Patrícia Feksa, Karin Wissheimer e Lara Isys, minhas moedinhas de ouro, meu super obrigado por tudo! De coração! Pela amizade, pelos conselhos e pela lealdade.

Não poderia deixar de agradecer ao Vagner Fagnani Linartevichi. Por ser atemporal, pela atenção, carinho, paciência, compreensão nos momentos difíceis, incentivo, por todo auxílio prestado e por sempre acreditar em mim.

Aos amigos Edson Rolim da Silveira, Valerí Schmidt e Talita Camargo pela paciência no convívio diário.

Ao Angelo Castrogiovanni, pelo auxílio propulsor no qual o embasamento científico desta etapa pudesse ser aprimorado.

Ao Ninão, à Medéia e à Branca pela participação neste protocolo.

Aos amigos e colaboradores Emily De Conto, Letícia Wildner, Maiara Luttz, Luciano e Marcelo Souza: sempre bem-humorados, pacientes e

dispostos. Por todo o apoio técnico indispensável para a realização deste trabalho, agradeço de coração!

À colaboração da doutoranda Luisa Amália Diehl pelo auxílio em determinadas atividades experimentais desenvolvidas. Obrigado pela paciência e pela disposição em ajudar!

Aos demais colegas de laboratório, por toda a amizade e tolerância, pelo apoio técnico e pela experiência compartilhada, otimizando o trabalho e tornando-o menos árduo. Adolfo Reis, Ana Raquel Karkow, Ana Lúcia Ceconello, Caroline Perinazzo, Everson Menezes, Felipe Rocha, Helena Basso, Jeferson Kika Guilherme, Lígia Centenaro, Márcia Scherem, Marcelo Herberts, Simone Louzada, Thiago Henriques, Vanise Sebben.

À colaboração de Paula na limpeza e organização do biotério.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Fisiologia e deste Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências da UFRGS, pela cortesia, profissionalismo e dedicação de sempre.

Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos que, cientes ou não, contribuíram para que eu pudesse concluir esse trabalho.

Índice

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XXII
RESUMO	XXIII
ABSTRACT	XXV
1. INTRODUÇÃO	01
2. HIPÓTESE	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 - Objetivo geral	12
3.2 - Objetivos específicos	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 - Local de Realização	14
4.2 - Comitê de Ética em Pesquisa Institucional	14
4.3 – Animais	15
4.3.1 – Fêmeas	15
4.3.2 – Filhotes	16

4.4 - Cálculo do tamanho amostral	16
4.5 - Grupos experimentais	17
4.5.1 - Grupos de gestantes	17
4.6 - Padrões adicionais adotados neste protocolo	20
4.7 - Delineamento experimental	21
4.7.1 - Procedimento de estresse pré-natal	21
4.7.2 - Procedimento de estresse pós-natal	22
4.7.3 - Observação do comportamento maternal	23
4.7.4 - Observação do comportamento agressivo maternal	25
4.7.5 - Teste agudo de nado forçado	26
4.7.6 - Teste de labirinto em cruz elevado	28
4.7.7 - Desenho experimental	30
4.8 - Descarte de animais	30
4.9 - Análise estatística	30
4.10 - Fontes de financiamento	31
5. RESULTADOS	32
5.1 - Dias em estresse pré-natal	32
5.2 - Número total de filhotes	33
5.3 - Comportamento maternal	34
5.3.1 - Construção de ninho	36
5.3.2 – Amamentação	37
5.3.3 - Interação com os filhotes	38
5.3.4 - Mãe no ninho sem posição de amamentação	39
5.3.5 - Freqüência de lambidas	40

5.3.6 - Permanência fora do ninho	41
5.4 - Comportamento agressivo maternal	42
5.4.1 - Postura agressiva	42
5.4.2 - Investigação social	43
5.4.3 - Interação com os filhotes	44
5.4.4 – Mobilidade	45
5.4.5 – <i>Rearing</i>	46
5.4.6 – <i>Grooming</i>	46
5.4.7 - Ataque frontal	47
5.4.8 - Ataque lateral	48
5.4.9 - Morder a cabeça do intruso	48
5.4.10 - Morder o corpo do intruso	49
5.4.11 – Imobilidade	50
5.5 - Teste agudo de nado forçado	50
5.6 - Labirinto em cruz elevado	53
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	63
8. PERSPECTIVAS	64
8.1 - Dosagens hormonais	64
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

10.ANEXOS A

 10.1 - Anexo I A

 10.1.1 - Construção de ninho B

 10.1.2 – Amamentação D

 10.1.3 - Interação com os filhotes F

 10.1.4 - Mãe no ninho sem posição de amamentação H

 10.1.5 - Número de lambidas J

 10.1.6 - Permanência da mãe fora do ninho L

Lista de Figuras

Figura 1. Rata submetida ao estresse pré-natal – restrição de maravalha – durante a última semana do período gestacional (7 ± 1 dias antes da parturição)

Figura 2. Procedimento de estresse pré-natal.

Figura 3. Procedimento de estresse pós-natal.

Figura 4. Imagem demonstrando uma rata submetida ao procedimento de estresse pós-natal.

Figura 5. Comportamento maternal.

- A. Lambida
- B. Amamentação com dorso muito arqueado.
- C. Amamentação com dorso pouco arqueado.
- D. Amamentação em supino.

Figura 6. Registro do comportamento maternal realizado para cada rata lactante.

Figura 7. Ficha utilizada para a realização do registro do comportamento maternal.

Figura 8. Teste de labirinto em cruz elevado.

Figura 9. Delineamento experimental.

Figura 10. Permanência de dias em estresse pré-natal.

Figura 11. Número total de filhotes.

Figura 12. Construção do ninho.

- A. Freqüências totais diárias de construção do ninho.
- B. Médias semanais de construção do ninho.

Figura 13. Amamentação.

- A. Freqüências totais diárias de amamentação.
- B. Médias semanais de amamentação.

Figura 14. Interação com os filhotes.

- A. Freqüências totais diárias de interação com os filhotes.
- B. Médias semanais de interação com os filhotes.

Figura 15. Mãe no ninho sem posição de amamentação.

- A. Freqüências totais diárias de mãe no ninho sem posição de amamentação.
- B. Médias semanais de mãe no ninho sem posição de amamentação.

Figura 16. Freqüências de lambidas.

- A. Freqüências totais diárias de lambidas.
- B. Médias semanais de lambidas.

Figura 17. Permanência fora do ninho.

- A. Freqüências totais diárias de permanência fora do ninho.
- B. Médias semanais de permanência fora do ninho.

Figura 18. Postura agressiva

- A. Latências de postura agressiva.
- B. Freqüências de postura agressiva.
- C. Porcentagens de tempo de postura agressiva.

Figura 19. Investigação social.

- A. Latências de investigação social.
- B. Freqüências de investigação social.
- C. Porcentagens de tempo de investigação social.

Figura 20. Interação com os filhotes.

- A. Latências de interação com os filhotes.
- B. Freqüências de interação com os filhotes.

C. Porcentagens de tempo de interação com os filhotes.

Figura 21. Mobilidade

A. Latências de mobilidade.

B. Freqüências de mobilidade.

C. Porcentagens de tempo de mobilidade.

Figura 22. *Rearing*.

A. Latências de *rearing*.

B. Freqüências de *rearing*.

C. Porcentagens de tempo de *rearing*.

Figura 23. *Grooming*.

A. Latências de *grooming*.

B. Freqüências de *grooming*.

C. Porcentagens de tempo de *grooming*.

Figura 24. Ataque frontal.

A. Latências de ataque frontal.

B. Freqüências de ataque frontal.

C. Porcentagens de tempo de ataque frontal.

Figura 25. Ataque lateral.

A. Latências de ataque lateral.

B. Freqüências de ataque lateral.

C. Porcentagens de tempo de ataque lateral.

Figura 26. Morder a cabeça do intruso.

A. Latências de morder a cabeça do intruso.

B. Freqüências de morder a cabeça do intruso.

C. Porcentagens de tempo de morder a cabeça do intruso.

Figura 27. Morder o corpo do intruso.

A. Latências de morder o corpo do intruso.

B. Freqüências de morder o corpo do intruso.

C. Porcentagens de tempo de morder o corpo do intruso.

Figura 28. Imobilidade.

A. Latências de imobilidade.

B. Freqüências de imobilidade.

C. Porcentagens de tempo de imobilidade.

Figura 29. Teste agudo de nado forçado.

A. Freqüências totais de movimentação, imobilidade e *climbing*.

B. Latências de movimentação, imobilidade e *climbing*.

C. Porcentagens de tempos de movimentação, imobilidade e *climbing*.

D. Porcentagens de freqüências totais de movimentação, imobilidade e *climbing*.

Figura 30. Labirinto em cruz elevado.

- A. Porcentagem de permanência nos braços abertos.
- B. Porcentagem de permanência nos braços fechados.
- C. Porcentagem de frequência de entradas nos braços abertos.
- D. Porcentagem de frequência de entradas nos braços fechados.

Figura 31. Construção do ninho.

- A. Frequências de construção do ninho. Dia 2 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- B. Frequências de construção do ninho. Dia 3 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- C. Frequências de construção do ninho. Dia 4 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- D. Frequências de construção do ninho. Dia 5 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

Figura 32. Construção do ninho.

- A. Frequências de construção do ninho. Dia 6 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- B. Frequências de construção do ninho. Dia 7 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- C. Frequências de construção do ninho. Dia 8 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

Figura 33. Amamentação.

- A. Frequências de amamentação dia 2 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- B. Frequências de amamentação dia 3 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- C. Frequências de amamentação dia 4 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- D. Frequências de amamentação dia 5 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

Figura 34. Amamentação.

- A. Frequências de amamentação dia 6 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- B. Frequências de amamentação dia 7 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- C. Frequências de amamentação dia 8 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

Figura 35. Interação com os filhotes.

- A. Frequências de interação com os filhotes dia 2 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- B. Frequências de interação com os filhotes dia 3 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- C. Frequências de interação com os filhotes dia 4 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

D. Frequências de interação com os filhotes dia 5 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

Figura 36. Interação com os filhotes.

A. Frequências de interação com os filhotes dia 6 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

B. Frequências de interação com os filhotes dia 7 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

C. Frequências de interação com os filhotes dia 8 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

Figura 37. Mãe no ninho sem posição de amamentação.

A. Frequências de mãe no ninho sem posição de amamentação dia 2 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

B. Frequências de mãe no ninho sem posição de amamentação dia 3 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

C. Frequências de mãe no ninho sem posição de amamentação dia 4 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

D. Frequências de mãe no ninho sem posição de amamentação dia 5 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

Figura 38. Mãe no ninho sem posição de amamentação.

A. Frequências de mãe no ninho sem posição de amamentação dia 6 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

B. Freqüências de mãe no ninho sem posição de amamentação dia 7 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

C. Freqüências de mãe no ninho sem posição de amamentação dia 8 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

Figura 39. Número de lambidas.

A. Freqüências de número de lambidas dia 2 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

B. Freqüências de número de lambidas dia 3 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

C. Freqüências de número de lambidas dia 4 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

D. Freqüências de número de lambidas dia 5 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

Figura 40. Número de lambidas.

A. Freqüências de número de lambidas dia 6 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

B. Freqüências de número de lambidas dia 7 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

C. Freqüências de número de lambidas dia 8 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

Figura 41. Permanência fora do ninho.

- A. Frequências de permanência fora do ninho dia 2 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- B. Frequências de permanência fora do ninho dia 3 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- C. Frequências de permanência fora do ninho dia 4 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- D. Frequências de permanência fora do ninho dia 5 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

Figura 42. Permanência fora do ninho.

- A. Frequências de permanência fora do ninho dia 6 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- B. Frequências de permanência fora do ninho dia 7 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.
- C. Frequências de permanência fora do ninho dia 8 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

Lista de Abreviaturas

- ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico
- AVP – Hormônio arginina vasopressina
- CRH – Hormônio liberador de corticotrofinas
- CORT – Hormônio corticosterona
- GH – Hormônio do crescimento
- GR – Promotor do receptor de glicocorticóide
- HPA – Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
- LC – *Locus Coeruleus*
- N – Número Amostral
- NA – Noradrenalina
- ODC – Ornitina descarboxilase
- PRL – Hormônio Prolactina
- PVN – Núcleo paraventricular do hipotálamo
- SNC – Sistema Nervoso Central

Resumo

O comportamento maternal em ratas consiste de vários elementos integrados que estão relacionados com a nutrição e o cuidado dos filhotes. Interações na relação mãe-filhote são importantes para o crescimento e desenvolvimento adequados dos mamíferos. A interrupção de estímulos sensoriais providos pela mãe tem efeitos negativos no desenvolvimento da ninhada em muitas espécies. Em modelos animais tratamentos estressores às fêmeas prenhas ocasionam mudanças notáveis na fisiologia e no comportamento de sua ninhada, podendo causar numerosas disfunções tanto nas mães quanto em seus filhotes

O presente trabalho tem por objetivo investigar os efeitos de dois tipos de eventos estressores ambientais durante o período perinatal - restrição de substrato para a construção do ninho e apresentação de um predador natural - bem como suas diferentes combinações, sobre o padrão comportamental da relação da mãe para com sua cria, em ratas *wistar*, bem como seu padrão de comportamento agressivo, possíveis comportamentos tipo-depressivos e o nível de ansiedade destes animais.

Como resultado, observa-se no presente trabalho que, os estresses ambientais aplicados durante o período perinatal não ocasionaram alterações significativas nos comportamentos relacionados ao cuidado maternal ou ao

comportamento agressivo maternal. Entretanto, observou-se um padrão diferenciado de cuidado maternal nas fêmeas submetidas aos eventos estressores estudados. Além disso, não foram observados comportamentos tipo-depressivos (medidos pelo teste agudo de nado forçado) ou aumento do nível de ansiedade (medido pelo teste de labirinto em cruz elevado) destas mães submetidas a estes paradigmas.

Abstract

Maternal behavior in rats consists of several integrated elements that are related to nutrition and care of the offspring. Mother-pup interactions are important for proper growth and development of mammals. The interruption of sensory stimulation provided by the mothers has negative effects on offspring's development in many species. In animal models stressors treatment applied to pregnant females causes dramatic changes in their offspring's physiology and behavior, which may cause many disorders in both mothers and pups.

This study aimed to investigate the effects of two types of environmental stressors during the perinatal period - the restriction of substrate for nest building and exposure to a natural predator - as well as their different combinations on the behavioral pattern of the mother's relationship towards their offspring in *Wistar* rats, as well as their pattern of aggressive behavior, possible depressive-like behavior and anxiety level.

As a result it was observed in this study that the environmental stresses applied during the perinatal period did not produce significant changes in behaviors related to maternal care or maternal aggressive behavior in females subjected to the stressful events studied. However, there was a distinct pattern of maternal care in females subjected to stressful events studied. Furthermore, depressive-like behaviors (measured by acute forced swim test) or anxiety

(measured by the elevated plus maze test) were not observed in these mothers subjected to these paradigms.

Introdução

O Comportamento Maternal

O comportamento maternal em ratas consiste de vários elementos integrados que estão relacionados com a nutrição e o cuidado dos filhotes. Eles podem envolver diretamente os filhotes (amamentação, lambida, busca de filhotes) ou não (construção de ninhos, agressão maternal). Este padrão complexo aparece espontaneamente em mães primíparas. Perto da data do parto, a mãe inicia uma seqüência de mudanças comportamentais que visam receber adequadamente os filhotes (Numan & Insel, 2003). Ela muda seus padrões de limpeza corporal, levando mais tempo na limpeza da região mamária e, alguns dias antes do parto, ela constrói um ninho com o substrato disponível (Numan, 1988).

Uma das hipóteses que poderia explicar o rápido surgimento do comportamento maternal seriam as mudanças hormonais que ocorrem no término da gestação (Numan, 1994). No final da gestação e durante os primeiros dias de lactação, a fêmea passa por mudanças hormonais (Byrnes & Bridges, 2006; Numan, 1994) e comportamentais importantes que induzem e habilitam-na a proteger e orientar a ninhada (Poindron, 2005; Stern & Johnson, 1990).

Entretanto, uma vez estabelecida a interação mãe-filhote, a resposta maternal passa a ser induzida por estímulo dos filhotes, independentemente da ação

hormonal (Van Leengoed *et al.*, 1987). A rata lactante precisa de vários estímulos, além das mudanças hormonais causadas pela gestação em si, para estabelecer uma resposta maternal. O principal estímulo é a presença dos filhotes, que atrai a atenção da mãe, com alguns comportamentos como vocalizações e movimentos do corpo (Pawluski *et al.*, 2009; Polan & Hofer, 1999) e pelo olfato (Poindron, 2005; Lévy *et al.*, 2004; Lévy, 1998; Moore, 1985; Jans & Leon, 1983).

Os filhotes de ratos, assim como a maioria dos roedores, nascem altriciais, isto é, são parcialmente imóveis, desprovidos de pêlos, surdos e cegos, incapazes de se locomover e de regular sua temperatura (Grota & Ader, 1969; 1975). Durante o período da lactação, as mães apresentam comportamento de cuidar dos filhotes e manifestam-no pela busca dos mesmos quando estes se afastam do ninho, pela estimulação da micção por meio da lambida anogenital, pelo posicionamento sobre os filhotes para provê-los de nutrição e calor, pela construção do ninho e por defesa contra intrusos (Grota & Ader, 1969; Stern & Johnson, 1990; Albert & Walsh, 1995). Até aproximadamente o 12º dia de vida é a mãe quem toma a iniciativa de se aproximar dos filhotes. Sendo assim, a variação no cuidado maternal pode ser considerada o diferencial para as experiências sensoriais no desenvolvimento dos filhotes. Após esse período, os filhotes estão aptos a se locomover e a deixar o ninho, então são eles que se aproximam da mãe para requerer cuidados (Grota, 1975).

O comportamento maternal é caracterizado por uma ritmicidade, sendo mais intenso durante o dia e, no ciclo claro-escuro, sofre uma inversão a cada três dias. A mãe não altera a maioria dos comportamentos em relação aos filhotes, mas altera a periodicidade deste, isto é, ela começa a ter cuidado maternal durante o período escuro e também durante o período claro (Schelstraete *et al.*, 1992).

Interações na relação mãe-filhote são importantes para o crescimento e desenvolvimento adequados dos mamíferos. A interrupção de estímulos sensoriais providos pela mãe tem efeitos negativos no desenvolvimento da ninhada em muitas espécies (Schanberg & Kuhn, 1980; Pauk *et al.*, 1986).

O estabelecimento de uma interação normal entre a mãe e o filhote é crítico para o crescimento e o desenvolvimento comportamental na maioria das espécies de mamíferos (Moriceau & Sullivan 2005, Sullivan 2003). A realização de comportamentos recíprocos entre a mãe e o filhote aumenta a chance do filhote sobreviver, e vindo a sobreviver, ele irá se reproduzir e criar, com sucesso, seus próprios filhos (Insel & Young 2001, Anand & Scalzo 2000, Fleming *et al.* 1999).

Em ratos, diferenças individuais nas respostas comportamentais e endócrinas ao estresse estão associadas com as variações que ocorrem sobre o cuidado maternal durante a infância (Caldji *et al.*, 1998, McCarty *et al.*, 1992;). Isso inclui uma redução na atividade de ornitina descarboxilase (ODC), que é um índice sensível de crescimento e diferenciação celular, na diminuição da secreção do hormônio do crescimento (GH), bem como um aumento na secreção de corticosterona (CORT) (Pauk *et al.*, 1986).

Há dados que demonstram, em ratos, ocorrer variações naturais no cuidado maternal que alteram permanentemente o comportamento e a regulação neuroquímica dos filhotes (Champagne *et al.* 2003, Bredy *et al.*, 2003; Levine *et al.* 2001, Francis *et al.*, 2002). Liu *et al.* (1997) mostraram que os filhotes de mães que permanecem mais tempo com os mesmos, lambendo-os mais, quando adultos apresentam um aumento da concentração de receptores para glicocorticóides no hipocampo e uma menor secreção de ACTH e corticosterona em resposta ao estresse.

Respostas Ao Estresse

A homeostase é um processo de coordenação fisiológica o qual mantém estável a maior parte dos estados no organismo. Este equilíbrio estável pode ser constantemente ameaçado por uma variedade de distúrbios ou estímulos, tanto externos quanto internos. Nestas situações de ameaça ou perigo, os organismos desencadeiam diversas respostas adaptativas que visam manter a homeostasia, chamadas de respostas ao estresse. As respostas ao estresse, que habilitam um organismo a enfrentar uma ameaça ou desafio de estímulos ambientais, consistem em um complexo conjunto de componentes endócrinos, neurovegetativos e comportamentais (Caldji *et al.*, 2001; Johnstone *et al.*, 2000; Patin *et al.*, 2002; Rima *et al.*, 2009, Kiaer *et al.*, 2010).

Os dois principais sistemas neuroendócrinos envolvidos em integrar as respostas a um estressor são o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o sistema neurovegetativo simpático. A ativação do eixo HPA resulta na liberação de cortisol ou corticosterona do córtex da adrenal. O aumento da atividade catecolaminérgica e da ativação deste eixo integrado com diversos outros sistemas neuroendócrinos regula a função vascular e a captação de energia, facilitando as respostas comportamentais adequadas e servindo para manter a homeostase (Meaney *et al.*, 1993; Meerlo *et al.*, 1999). Para que isto ocorra, os neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo, sintetizam e secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina-vasopressina (AVP), que irão atuar ativando a hipófise anterior e promovendo a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este, por sua vez irá promover a secreção de glicocorticóides pelo córtex da adrenal (Handa *et al.*, 1994; Francis *et al.*, 1996; Herman & Cullinan, 1997).

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

Estudos com modelos animais demonstraram um decréscimo induzido pelo estresse durante o período de lactação nas concentrações plasmáticas de ocitocina (Carter & Lightman, 1987; Higuchi *et al.*, 1988; Neumann *et al.*, 1993), catecolaminas, prolactina (Higuchi *et al.*, 1989), ACTH e corticosterona (Stern *et al.*, 1973; Walker *et al.*, 1992; Windle *et al.*, 1997).

A ativação do sistema neurovegetativo simpático também é induzida em resposta ao estresse e resulta na liberação de noradrenalina (NA) nos terminais sinápticos e pela medula da adrenal na corrente sanguínea, onde juntamente com os glicocorticóides irá aumentar a lipólise, a glicogenólise e o catabolismo de proteínas. Além desta descarga periférica, o estresse também induz a secreção de noradrenalina no SNC, sendo que grande parte origina-se no *Locus coeruleus* (LC) (Melia & Duman, 1991; Konstandi *et al.*, 2000). Assim, as catecolaminas promovem diversas alterações nas funções vegetativas, o que irá contribuir para que o organismo mantenha o equilíbrio homeostático durante o estresse (Kopin, 1995).

A corticosterona é um dos principais hormônios avaliados na resposta a diversos tipos de estressores, entretanto a prolactina (PRL) também responde a esses estímulos, sendo utilizada como um eficiente marcador da resposta ao

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

Estresse Perinatal

Nas últimas décadas tem se demonstrado um incrível aumento de interesse no tópico de influências ambientais sobre a fisiologia e comportamento de organismos (Kalinichev *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2008; Baker *et al.*, 2009). Várias evidências indicam que a exposição a eventos adversos no início da vida pode aumentar a vulnerabilidade a inúmeras psicopatologias na vida adulta (Heim *et al.*, 1997; Ladd *et al.*, 2000; Caldji *et al.*, 2001).

Muitos estudos observacionais de modelo de estresse já são relatados em seres humanos, entre eles, estresse pré-natal em mulheres, onde se tem demonstrado diversas variações desse desequilíbrio fisiológico como: índices abortivos, dificuldades durante o parto, baixo peso dos neonatos e altas

percentagens de descendentes prematuros (Homer *et al.*, 1990). Além disso, alguns autores sugerem a existência de uma relação entre o estresse psicológico maternal e o aumento, nos filhos, da incidência de sintomatologia de esquizofrenia e depressão (Huttunen & Niskanen, 1978; Van Os. *et al.*, 1998; Watson *et al.*, 1999; Gutteling *et al.* 2005).

Em modelos animais, tratamentos estressores às fêmeas prenhas ocasionam mudanças notáveis na fisiologia e no comportamento de sua ninhada (Patin *et al.*, 2005; Darnaudéry & Maccari, 2008). Eles podem causar numerosas disfunções tanto nas mães quanto em seus filhotes (Becker *et al.*, 1977; Barlow *et al.*, 1978; Power *et al.*, 1986; Peters, 1988; Weinstock *et al.*, 1988; Henry *et al.*, 1994; Maccari *et al.*, 1995; Pardon *et al.*, 2000). Esse tipo de estudo tem sido examinado de uma maneira mais extensiva, principalmente em ratos, onde alterações nesse período, além de causar efeitos já comentados anteriormente, ainda podem fazer com que ocorram nesses animais hiperatividade, emocionalidade aumentada e déficits cognitivos neurológicos (Stott, 1973; Smith *et al.*, 1981; Grimm *et al.*, 1987; Weller *et al.*, 1988; Weinstock *et al.*, 1992; Poltyrev *et al.*, 1996; Weinstock, 1997; Götz *et al.*, 2008). Além disso, outras pesquisas mostram que o estresse durante esse período afeta tanto a capacidade como a discriminação do aprendizado no *water maze* em ratos (Smith *et al.*, 1981).

O estresse pré-natal de forma repetida produz déficits comportamentais, mas essas alterações não parecem ser diferentes quanto comparadas com os produzidos por um estresse de forma mais aguda, como por exemplo, um predador natural (um gato). Nesse estudo de apresentação a um predador natural ainda pode-se verificar que as concentrações de corticosterona de mães estressadas foram bem superiores aos das mães controles (Lordi *et al.*, 2000).

O estresse, no período da lactação em ratos afeta também a relação mãe-filhote. Estudos demonstraram que alterações ou interferências nesta relação podem provocar distúrbios, modificando o comportamento da mãe em relação aos filhotes, causando assim mudanças comportamentais, neuroendócrinas, imunológicas e neurais que parecem perdurar ao longo da vida do animal (Arnsten, 1998; Gomes *et al.*, 1999; Meerlo *et al.*, 1999; Padoin *et al.*, 2001; Champagne *et al.*, 2003; Giovenardi *et al.*, 2005).

Em humanos, pesquisas demonstraram que a depressão é comum durante a gestação e é associada com indicadores de privação sócio-econômica, violência e perda de um relacionamento íntimo, e com uma prévia história de depressão (Lovisi *et al.*, 2005). Atualmente, muitas questões sobre os mecanismos de ação envolvidos na depressão pós-parto ainda permanecem desconhecidas (Bennett *et al.*, 2004).

No período próximo ao parto, uma gama de alterações comportamentais e endócrinas têm sido relatadas em relação à responsividade ao estresse em inúmeras espécies, incluindo: ratos, ovelhas e humanos, por meio de adaptações de quase todos os níveis do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Estas adaptações podem incluir alterações nos processos de percepção ao estressor em regiões límbicas do encéfalo, na avaliação emocional de um estímulo externo, resultando em: (1) uma resposta comportamental alterada a um dado estressor (Walker *et al.*, 1995; Windle *et al.*, 1997b; Neumann *et al.*, 1998; Lightman *et al.*, 2001); e (2) alterações de inputs excitatórios e inibitórios aos neurônios hipotalâmicos do núcleo paraventricular (PVN) e/ou núcleo supraóptico (Toufexis & Walker, 1996; Douglas *et al.*, 1998) sintetizando o hormônio liberador de corticotrofinas (CRH), ocitocina ou vasopressina.

Conseqüentemente, a atividade de neurônios de hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) e de vasopressina, os quais representam ser os principais reguladores da síntese e secreção do hormônio adenocorticotrófico (ACTH) no nível da adenohipófise do eixo HPA, é esperadamente alterada.

Uma diminuição na atividade do sistema CRH, por exemplo, incluindo a síntese de CRH no PVN (Douglas & Russell, 1994) e a ligação de CRH na adenohipófise (Neumann *et al.*, 1998) demonstrada no período final da gestação pode, ao menos em parte, somar para a redução da liberação de ACTH e conseqüentemente de corticosterona no sangue em resposta a um estímulo externo tanto durante o período de gestação quanto no período de lactação (humanos: Altemus *et al.*, 1995; ratos: Stern *et al.*, 1973; Lightman & Young III, 1989; Walker *et al.*, 1995; Windle *et al.*, 1997b; Neumann *et al.*, 1998; ovelhas: Keller-Wood, 1995).

Além dessas alterações no processamento do estímulo recebido, alterações dos mecanismos de retroalimentação negativa do eixo HPA dado por glicocorticóides via receptores mineralo e glicocorticóides presentes nos níveis límbico, hipotalâmico e adenohipofisário, podem resultar em um deslocamento do ponto excitatório da resposta ao estresse no período periparto (Johnstone *et al.*, 1998, 2000). Além disso, embora altamente ativados no período pós-parto a fim de garantir as funções reprodutivas, o sistema ocitocinérgico responde pouco a estímulos não diretamente ligados a eventos reprodutivos e é atenuado conforme indicado por uma redução na secreção de ocitocina no sangue em resposta a diversos estímulos (Carter & Lightman, 1987; Neumann *et al.*, 1995, 1998; Walker *et al.*, 1995; Douglas & Russell, 2001).

O aumento da atividade encefálica do sistema ocitocinérgico no período pós-parto leva à hipótese de uma participação de ocitocina nas adaptações comportamentais e neuroendócrinas vista neste momento (Neumann, 2001).

Baseado nesse conjunto de dados, o presente trabalho tem por objetivo investigar os efeitos de diferentes tipos de eventos estressores durante o período perinatal, bem como suas diferentes combinações, sobre o padrão comportamental da relação da mãe para com sua cria, em ratas *wistar*.

Hipótese

Considerando-se que eventos ambientais que ocorram no período perinatal produzem efeitos sobre aspectos comportamentais e neuroendócrinos das fêmeas de inúmeras espécies e que, estes se manifestam na diminuição ou redução do comportamento maternal, diminuição do comportamento agressivo maternal, aumento da ansiedade e em alterações dos níveis hormonais responsivos a eventos estressores e/ou relacionados ao comportamento maternal, levantou-se a hipótese de que estímulos ambientais estressantes (restrição de substrato para construção do ninho, bem como a presença de um predador natural) combinados possam afetar os mecanismos que regulam o comportamento maternal, diminuindo a interação mãe-filhote.

Objetivos

O presente trabalho tem por objetivo analisar os efeitos da combinação de estímulos ambientais estressantes no período gestacional e nos dois primeiros dias pós-parto sobre o comportamento maternal de ratas lactantes. O modelo utilizado se trata de uma adaptação do protocolo experimental desenvolvido por Fenoglio *et al.*, 2006 cujo estímulo estressante aplicado em ratas lactantes foi a redução do substrato para a construção do ninho, o qual é um estímulo natural e relacionado ao comportamento maternal pois as mesmas, nos últimos dias de gestação, já começam a preparar o ninho, mantendo-o durante toda lactação. Pretendemos com isso associar o estresse a uma atividade do comportamento maternal, ou seja, ao fato da fêmea ter que cuidar de seus filhotes. Além disso, no primeiro dia após o parto, a rata foi exposta agudamente a um predador natural (gato – adaptado de Patin *et al.*, 2002). O presente protocolo combina estresse pré-parto e pós-parto da mãe.

Objetivos Específicos

Mais especificamente, este projeto pretendeu estudar os efeitos do estresse causados pelas variações do ambiente próximo ao parto e as alterações do comportamento maternal induzidas por este procedimento quando comparados a

animais que não sofreram nenhuma intervenção neste período. Dessa maneira, pretendeu-se induzir uma diminuição do comportamento maternal e do comportamento agressivo maternal juntamente com um aumento do nível de ansiedade destes animais. Para isso propomos:

Verificar os efeitos dos eventos estressores pré-natal (restrição de substrato) e pós-natal (apresentação a um predador natural), individualmente ou combinados, sobre: o comportamento maternal; nos parâmetros envolvidos no teste de comportamento agressivo maternal; nos parâmetros envolvidos no teste agudo de nado forçado e nos parâmetros envolvidos no teste de labirinto em cruz elevado.

Materiais e Métodos

Local de Realização

Todos os experimentos abaixo relacionados apresentaram condições de serem realizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Estes experimentos foram realizados no laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (laboratório 11 – ICBS – UFRGS), sob a orientação do professor Dr. Aldo Bolten Lucion e co-orientação da professora Dr. Annabel Ferreira – Universidad de La Republica (UDELAR – Montevideo - Uruguai).

Comitê de Ética em Pesquisa Institucional

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

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

Animais

Fêmeas

Foram utilizadas 56 ratas fêmeas adultas não prenhas (aproximadamente 40 dias), da variedade Wistar, provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As mesmas foram transferidas ao biotério setorial do laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento. Estas ratas aos 50 – 70 dias apresentando-se na fase estral Proestro foram colocadas em caixas-residência juntamente com um macho sexualmente ativo durante as primeiras horas do período noturno do ciclo, com maravalha servindo de substrato. Analisamos diariamente as fases do ciclo estral destas fêmeas para garantir a prenhez. As fêmeas apresentaram um monitoramento diário para que o parto fosse o mais controlado possível. Ao assegurarmos a prenhez da fêmea (analisando o ciclo estral e apresentando espermatozóides na secreção vaginal), esta foi disposta individualmente em uma caixa-residência contendo maravalha ou um pequeno montante da mesma como substrato (dependendo do grupo experimental que a mesma foi inserida) durante todo o período gestacional. Todos os animais foram mantidos no biotério setorial sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas, com início da fase escura às 18:30 horas. A temperatura do biotério foi mantida constante em torno de $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Todos os animais tiveram livre acesso à água e comida durante todo o período desta pesquisa.

Filhotes

Os filhotes foram mantidos juntamente com a fêmea durante todo o período de lactação. Tentamos minimizar a manipulação dos mesmos (tanto da mãe quanto dos filhotes), pois analisamos durante os primeiros 08 dias de lactação o comportamento maternal, sendo tal manipulação mantida apenas para a padronização do número de filhotes no dia da parturição (padronizado como 06 a 08 filhotes por ninhada) e para as limpezas das caixas-residências. No dia 09 pós-natal, os filhotes foram transferidos com sua respectiva mãe para outro compartimento para a realização da filmagem do comportamento agressivo maternal. Estes filhotes foram descartados a partir do 21^o dia (pós-desmame) seguindo todos os procedimentos exigidos pelo Comitê de Ética desta Instituição de Ensino, quando todos os experimentos com mães e filhotes já tinham sido concluídos. Todos os animais foram mantidos no biotério sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas, com início da fase escura às 18:30 horas. A temperatura do biotério foi mantida constante em torno de 22°C±1°C. Todos os animais tiveram livre acesso à água e comida durante todo o período desta pesquisa.

Cálculo do tamanho amostral

Comportamento Maternal: Para a realização dos testes de comportamento maternal o n amostral foi calculado para a variável freqüência de lambe os filhotes, com base em estudos realizados pelo grupo SMITH *et al.*, 2004. Foi considerado um poder de 99.9% para um nível de significância de $p < 0.05$. n calculado de 17 animais por grupo.

Comportamento Agressivo Maternal: Para a realização dos testes de comportamento agressivo maternal o n amostral foi o mesmo utilizado para os testes de comportamento maternal, visto que as mesmas ratas foram submetidas a este protocolo experimental.

Teste de Nado Forçado: Para a realização dos testes de nado forçado o n amostral foi o mesmo utilizado para os testes de comportamento maternal, visto que as mesmas ratas foram submetidas a este protocolo experimental.

Teste de Labirinto em Cruz Elevado: Para a realização dos testes de labirinto em cruz elevado o n amostral foi o mesmo utilizado para os testes de comportamento maternal, visto que as mesmas ratas foram submetidas a este protocolo experimental.

O número de amostras por grupo/por experimento variam entre os estudos, pois muitas vezes a gestação não se estabeleceu, o número de filhotes foi muito pequeno e a ninhada foi excluída dos experimentos ou por problemas nas análises das filmagens dos testes comportamentais.

Grupos Experimentais

Grupos de Gestantes

As ratas prenhas foram divididas em quatro grupos sendo seus respectivos n demonstrados entre parênteses:

- **Grupo controle (n = 14):** As fêmeas deste grupo foram dispostas em caixas-residência e, durante todo o período gestacional e pós-natal (08 primeiros dias pós-

parto), não foram apresentadas aos fatores de estresse utilizados neste experimento (restrição de maravalha ou apresentação ao predador) sendo, portanto, consideradas nossas fêmeas controle. As caixas foram higienizadas no dia da parturição e no 9º dia pós-parto.

- **Grupo estresse pré-natal (n = 14):** As fêmeas deste grupo foram dispostas em caixas-residências e, ao constatar-se a prenhez das mesmas, foram mantidas durante o período gestacional com pouco substrato (maravalha) e uma lâmina de papel filtro em suas devidas caixas (procedimento explicado adiante). Durante o período gestacional, estas fêmeas apresentaram a manipulação de suas caixas-residência minimizada, para que o agente estressor “redução de substrato” fosse o principal fator de impacto sobre o comportamento das mesmas. Para o devido fim, durante este período, as caixas-residência não foram limpas. No dia 0 (dia da parturição) as caixas-residência foram limpas e durante o restante do período experimental, o protocolo de higienização das caixas-residência foi mantido no padrão comum (sendo limpas no dia da parturição e no 9º dia pós-natal).

- **Grupo estresse pós-natal (n = 14):** As fêmeas deste grupo foram colocadas em caixas-residência e, ao constatar-se a prenhez das mesmas, foram mantidas durante o período gestacional em caixas-residência contendo um montante padrão normal de substrato (maravalha). No dia 01 pós-natal esta caixa-residência foi encaminhada à sala de análise nas primeiras horas do ciclo escuro (19:15 – 19:30 horas) e deixada lá durante um período de tempo para ambientalização da fêmea e seus filhotes a um novo ambiente. Após a ambientalização, as fêmeas deste grupo experimental foram apresentadas ao predador por duas vezes de 15 minutos, com

um intervalo de 15 minutos entre ambas as apresentações. As fêmeas foram transferidas novamente ao biotério setorial do laboratório de Neuroendocrinologia e ali mantidas durante todo o período de lactação (até o 15º dia pós-natal). Durante todo este experimento, as caixas-residência foram higienizadas normalmente seguindo o padrão comum do laboratório (sendo limpas no dia da parturição e no 9º dia pós-natal).

- **Grupo estresse pré e pós-natal (n = 14):** As fêmeas deste grupo foram dispostas em caixas-residências e, ao constatar-se a prenhez das mesmas, foram mantidas durante o período gestacional com pouco substrato (maravalha) e uma lâmina de papel filtro em suas devidas caixas (procedimento explicado adiante). Durante o período gestacional, estas fêmeas apresentaram a manipulação de suas caixas-residência minimizada, para que o agente estressor “redução de substrato” fosse o principal fator de impacto sobre o comportamento das mesmas. Para o devido fim, durante este período, as caixas-residência não foram limpas. No 01º dia pós-natal esta caixa-residência foi encaminhada à sala de análise nas primeiras horas do ciclo escuro (19:15 – 19:30 horas) e deixada lá durante um período de tempo para ambientalização da fêmea e seus filhotes a um novo ambiente. Após a ambientalização, as fêmeas deste grupo experimental foram apresentadas ao predador por duas vezes de 15 minutos, com um intervalo de 15 minutos entre ambas as apresentações. As fêmeas que foram utilizadas para os testes comportamentais foram transferidas novamente ao biotério setorial do laboratório de Neuroendocrinologia e ali mantidas durante todo o período de lactação (até o 15º dia pós-natal). Durante todo este experimento, as caixas-residência foram higienizadas

normalmente seguindo o padrão comum do laboratório (sendo limpas no dia da parturição e no 9º dia pós-natal).

Padrões adicionais adotados neste protocolo:

Seguindo o padrão de todos os grupos experimentais, todas as ratas pertencentes a este experimento (portanto, a todos os grupos) foram dispostas, durante o período gestacional até o primeiro dia pós-natal, em caixas-residência contendo uma lâmina de papel filtro (medidas: 37,5cm x 31cm) abaixo da maravalha disposta como substrato.

Para o grupo controle, a quantidade de maravalha disponibilizada durante este período foi de 120g de substrato dispostos sobre a lâmina de papel filtro.

Para os grupos que foram submetidos ao estresse pré-natal (Figura 1), a quantidade de maravalha disponibilizada durante este período foi de 20g de substrato dispostos sobre a lâmina de papel filtro.



Figura 1: Rata submetida ao estresse pré-natal - restrição de maravalha - durante a última semana do período gestacional (7 ± 1 dias antes da parturição);

Delineamento Experimental

Procedimento 1

Procedimento de estresse pré-natal

Para a realização do procedimento de estresse pré-natal, ratas prenhas com seu período de gestação devidamente confirmado por análises do ciclo estral foram dispostas em caixas-residência com restrição de substrato (maravalha) e uma lâmina de papel filtro (protocolo adaptado a partir de Fenoglio *et al.*, 2006 – Figuras 1 e 2) para a construção do ninho aproximadamente uma semana antes do parto. Durante o período gestacional, estas fêmeas apresentaram a manipulação de suas caixas-residência minimizada, para que o agente estressor “redução de substrato” fosse o principal fator de impacto sobre o comportamento das mesmas. Portanto, suas caixas não foram higienizadas nesta fase. No dia 01 pós-natal, as fêmeas que foram mantidas para posteriores testes comportamentais adotaram novamente o padrão comum de higienização das caixas-residência utilizados em nosso laboratório (a limpeza das caixas foi realizada duas vezes por semana até o final do experimento).

Modelo experimental

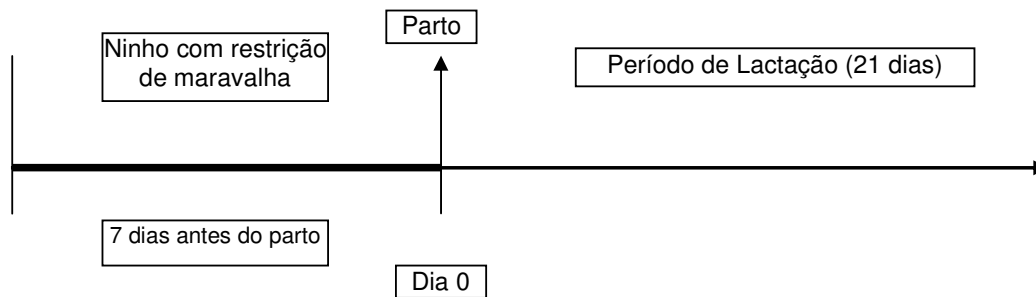


Figura 2: Procedimento de estresse pré-natal.

Procedimento de estresse pós-natal

A realização do procedimento de estresse pós-natal (Figura 3) ocorreu no primeiro dia pós-parto. No primeiro dia pós-natal (dia 01) a caixa-residência contendo a fêmea e sua ninhada foi transferida durante o período escuro dos ratos (19:15 – 19:30 horas) do biotério setorial do laboratório de Neurociências para uma sala de experimentos situada no próprio Instituto. A caixa-residência foi então mantida por um determinado tempo nesta nova sala para que a fêmea e os filhotes se adaptassem com o novo ambiente. Depois de constatada a ambientalização, uma gaiola contendo um gato adulto foi disposta sobre a caixa-residência contendo a fêmea e sua ninhada. Esta gaiola foi deixada nesta posição durante 15 minutos. Passados estes 15 minutos, esta gaiola foi retirada da sala de experimento por 15 minutos e, novamente, foi recolocada sobre a caixa-residência por mais 15 minutos (protocolo adaptado de Patin *et al.*, 2002 – Figura 4).

Modelo experimental

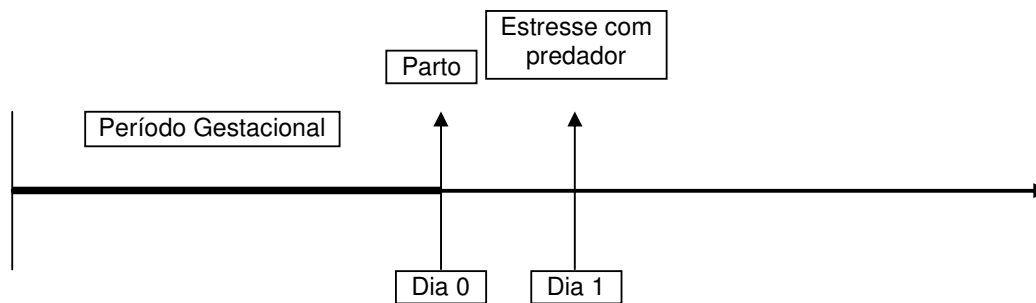


Figura 3: Procedimento de estresse pós-natal.

Figura 4: Imagem demonstrando uma rata submetida ao procedimento de estresse pós-natal;



Procedimento 2

Observação do comportamento maternal

O comportamento maternal nos quatro grupos de fêmeas lactantes (N=17 por grupo) foi observado diariamente em quatro seções de 72 minutos cada até o dia 08 pós-parto (Figura 6). As observações ocorreram em tempos regulares, sendo três períodos na fase clara (10:00, 13:00 e 16:00h) e um na fase escura (18:30h). Em cada período o comportamento das lactantes foi observado e registrado a cada 3 minutos (25 observações por período x 4 períodos por dia = 100 observações/mãe/dia – Figura 7). Os comportamentos analisados foram: (1) mãe com os filhotes; (2) mãe lambendo os filhotes (lamber a superfície do corpo e a região anogenital – Figura 5 A); (3) mãe amamentando com o dorso bem arqueado

(Figura 5 B); (4) mãe amamentando com o dorso pouco arqueado (Figura 5 C); (5) postura passiva de amamentação (Figura 5 D) e (6) permanência da mãe fora do ninho.

O parâmetro utilizado para cada comportamento foi a frequência.

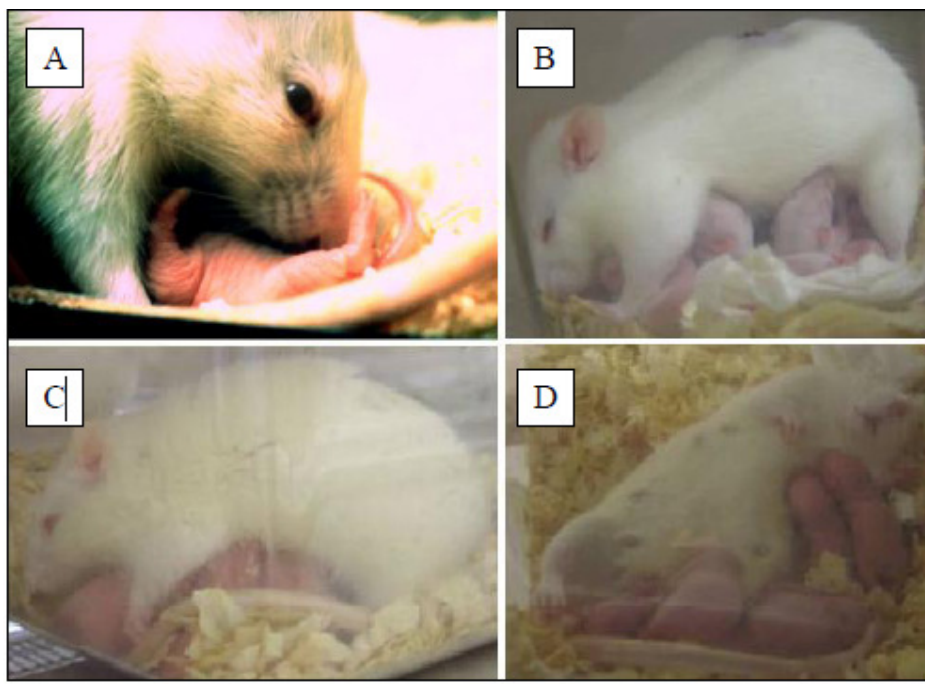
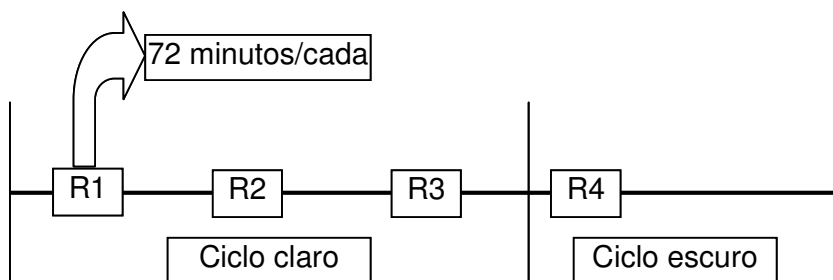


Figura 5: Comportamento maternal. **A.** Lambida. **B.** Amamentação com dorso muito arqueado. **C.** Amamentação com dorso pouco arqueado. **D.** Amamentação em supino.

Modelo experimental



*R= Registros

Figura 6: Registro do comportamento maternal realizado para cada rata lactante.

Ficha de registro do Comportamento Maternal

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

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

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

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

DATA: _____ DIAS PP: _____

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

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

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

Figura 7: Ficha utilizada para a realização do registro do comportamento maternal.

Procedimento 3

Observação do comportamento agressivo maternal

O registro de comportamento agressivo das fêmeas foi realizado no 9º dia pós-parto nas primeiras horas do ciclo escuro (a partir das 18:30 horas). Como uma forma de preparação para a realização deste teste, as fêmeas e seus respectivos filhotes foram colocadas no ambiente de filmagem durante um período antecipado

de tempo para que pudessem se acostumar ao novo ambiente, evitando assim que ocorressem alterações do seu padrão de comportamento.

Para a realização do teste foi colocado um macho intruso dentro da caixa-residência da fêmea por 10 minutos. Durante este período os comportamentos foram registrados em mídia e posteriormente analisados em um programa de computador.

Os comportamentos analisados foram: ataque frontal, no qual a fêmea ataca o intruso na direção da cabeça; ataque lateral, a fêmea ataca em direção ao corpo do intruso; morder o corpo, a fêmea morde o corpo do intruso; morder a cabeça, a fêmea morde o intruso na cabeça ou no pescoço; postura agressiva, a fêmea cerca o intruso e levanta uma das patas traseiras em direção ao intruso; investigação social, a fêmea investiga o intruso; interação com os filhotes, a fêmea interage de alguma maneira com a ninhada; caminhar, quando a fêmea caminha pela caixa; *rearing*, quando a fêmea levanta as duas patas dianteiras e as deixa sobre as bordas da caixa; *grooming*, auto-limpeza da fêmea.

Os parâmetros analisados para estes comportamentos foram as frequências e as durações.

Procedimento 4

Teste agudo de nado forçado

O teste de nado forçado é um teste comumente usado para medir o efeito de drogas antidepressivas no comportamento de animais de laboratório ou é tido como um protocolo “padrão” para que se possa indicar comportamentos depressivos em animais de laboratório (tipicamente ratos ou camundongos). A maior parte dos

modelos animais de depressão, como o nado forçado (Popova, J. S., Petkov, V. V., 1990) e o desamparo aprendido (Overmeir, J. B.; Seligman, M. E. P., 1967), avalia o desenvolvimento de alterações comportamentais e fisiológicas em resposta à pré-exposição a evento estressante inescapável.

O teste de nado forçado se utiliza de um container circular de água (50 centímetros de diâmetro com 75 centímetros de altura) contendo 50 centímetros de coluna de água (profundidade), tornando-o um lugar sem escapatória para as ratas, com temperatura controlada de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

As fêmeas foram submetidas ao treino de nado forçado (Trial) a uma sessão de 15 minutos no container de água no 10° dia pós-natal, durante as primeiras horas do período escuro (18:40 – 19:40 horas). Após esta sessão individual, as ratas foram colocadas em caixas para descanso, secas e então recolocadas em suas caixas-residência. No 11° dia pós-natal, durante o mesmo horário (primeiras horas do período escuro) as fêmeas foram submetidas ao teste de nado agudo forçado propriamente dito. Este teste consistiu de uma sessão individual de 5 minutos no container de água.

Utilizamos uma filmadora para que o teste comportamental fosse gravado em mídia e posteriormente analisado por um programa computacional.

Os parâmetros comportamentais analisados para este teste foram: imobilidade, locomoção e *climbing*, sendo que suas latências, suas freqüências e suas durações foram contabilizadas.

Procedimento 5

Teste de labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (Figura 8) é um modelo de ansiedade que é utilizado em larga escala como um teste para verificação de compostos ansiolíticos como também se trata de uma importante ferramenta na pesquisa neurobiológica de ansiedade.

O teste consiste de um aparelho com dois braços abertos (50 x 10cm cada um) e dois braços fechados (50 x 10cm cada um), todos com o teto aberto, sendo os braços fechados cercados por paredes laterais com 40cm de altura, elevado a 100cm do chão. O modelo é baseado na aversão de roedores a espaços abertos. Esta aversão leva ao comportamento que envolve a prevenção de áreas abertas ao limitar seus movimentos somente para os espaços fechados ou para as arestas de um espaço delimitado. No labirinto em cruz elevado esta característica se traduz em uma preferência de permanência nos braços fechados (Pellow *et al.*, 1985; Treit *et al.*, 1993; Rodgers, 1997; Carobrez e Bertoglio, 2005).

A redução de ansiedade no labirinto em cruz é indicada por um aumento na proporção de tempo gasto nos braços abertos (tempo nos braços abertos / tempo total nos braços abertos e fechados), e um aumento na proporção de entradas nos braços abertos (entradas nos braços abertos / total de entradas nos braços abertos e fechados). O número total de entradas nos braços e o número de entradas nos braços fechados são usualmente utilizados como medidas gerais de atividade (Hogg, 1996).

As fêmeas foram submetidas a este teste nas primeiras horas do ciclo escuro do 12º dia pós-natal. Elas foram dispostas individualmente no centro do aparato e,

com o auxílio de uma filmadora, registramos esta sessão única por 5 minutos. Após cada registro o aparato experimental foi totalmente limpo com álcool 70%, para a realização do próximo registro.

Os comportamentos que foram analisados no teste de labirinto em cruz elevado foram: permanecer no braço aberto (comportamento no qual a fêmea se apresenta com as quatro patas presentes em algum dos braços abertos); permanecer no braço fechado (comportamento no qual a fêmea se apresenta com as quatro patas presentes em algum dos braços fechados) e número de entradas nos braços abertos e fechados.

Os parâmetros utilizados para estes comportamentos foram as latências, as freqüências e as durações.

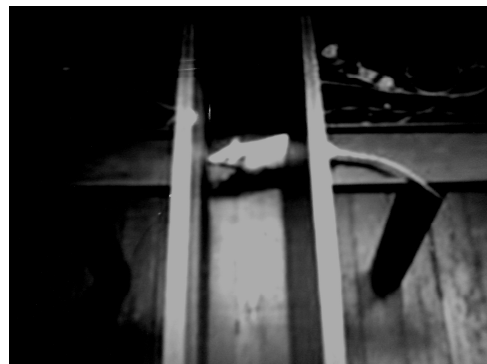


Figura 8: Teste de Labirinto em Cruz Elevado.

Desenho Experimental – Experimento Estresse Perinatal

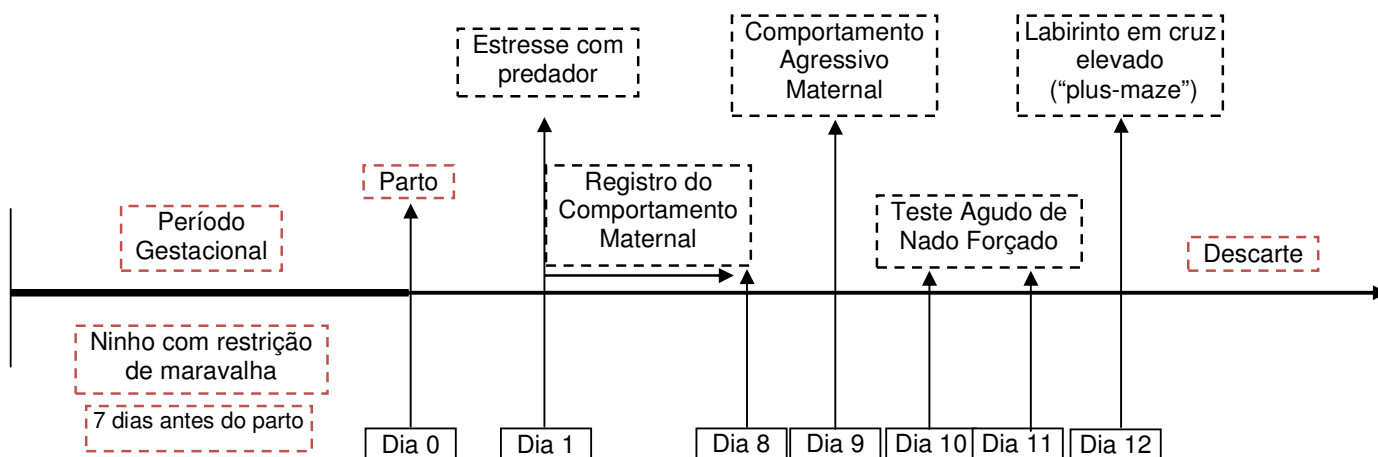


Figura 09: Delineamento Experimental.

Descarte de Animais

Após a realização de todos os procedimentos descritos, as mães (após passarem pelos testes comportamentais) e seus filhotes foram separadas em caixas identificadas como “descarte” no próprio biotério setorial de Neuroendocrinologia do Comportamento. A Técnica responsável por este laboratório encaminhou todos os animais ao biotério central da UFRGS para que os mesmos pudessem ser posteriormente descartados de maneira apropriada.

Análise Estatística

Para o cálculo das médias das frequências (\pm E.P.M.) foi utilizado um teste de normalidade para verificar se as variáveis apresentavam ou não uma distribuição normal utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov modificado por Lilliefors.

Após a identificação da forma de distribuição, foi-se utilizado um teste de homogeneidade para verificar se as variâncias seriam ou não diferentes entre si. Utilizamos o teste de Bartlett para tal análise.

Depois de constatada se as variâncias eram homogêneas ou heterogêneas continuamos com as análises estatísticas apropriadas.

Caso as variâncias fossem homogêneas utilizamos uma ANOVA de uma via e, quando apropriado, o teste de Newman-Keuls como pós-teste. Na interpretação dos resultados, foram consideradas significativas as diferenças com índice de significância de $p < 0.05$.

Caso as variâncias fossem heterogêneas utilizamos o teste de Kruskal-Wallis e, quando apropriado, o teste de Dunn como pós-teste. Na interpretação dos resultados, foram consideradas significativas as diferenças com índice de significância de $p < 0.05$.

O software estatístico utilizado para estas análises foi o GraphPad Prism 5.0.

Fontes de Financiamento

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Resultados

Dias em estresse pré-natal:

Para os dados relacionados aos grupos estresse pré-natal e estresse pré+pós-natal, analisamos a permanência destes animais em condições de gestacional para verificar se há ou não alguma diferença em relação ao tempo de exposição ao estresse. O número de animais por grupo são:

- Grupo Estresse Pré-Natal: 14 animais;
- Grupo Estresse Pré + Pós-Natal: 14 animais.

O gráfico está expresso em médias \pm erros médios padrões. Aplicamos o teste T de Student para comparações entre os dois grupos. O nível de significância aceito foi de $p < 0.05$.

Não se observou diferença na permanência de dias em estresse pré-natal entre os grupos estresse pré-natal e estresse pré + pós-natal (Figura 10).

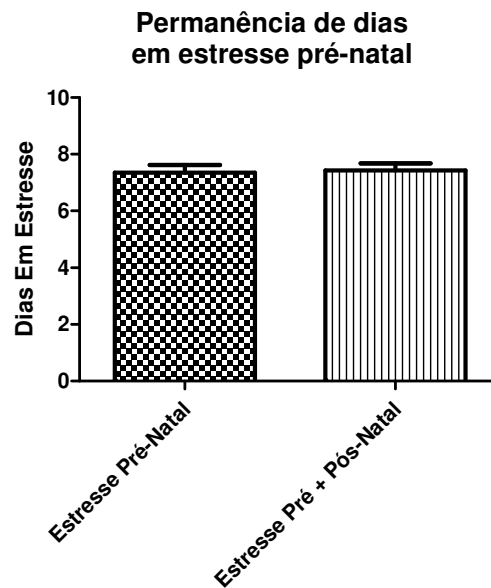


Figura 10. Permanência de dias em estresse pré-natal.

Número total de Filhotes:

Para os dados relacionados aos números totais de filhotes, analisamos a quantidade total de filhotes destes animais para verificar se há ou não alguma diferença em relação aos grupos estudados. O número de animais por grupo são:

- Grupo Controle: 14 animais;
- Grupo Estresse Pré-Natal: 14 animais;
- Grupo Estresse Pós-Natal: 14 animais;
- Grupo Estresse Pré + Pós-Natal: 14 animais.

O gráfico está expresso em médias \pm erros médios padrões. O nível de significância aceito foi de $p < 0.05$.

Não se observou diferença no número total de filhotes paridos entre o grupo controle e os grupos estressados [efeito fator ESTRESSE; $F(3,52)=0.2357$; $p=0.9922$ – Figura 11].

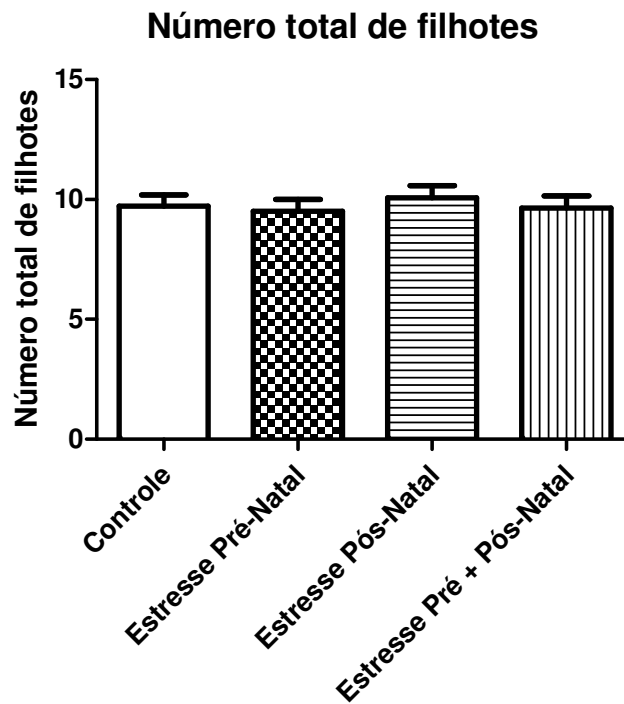


Figura 11. Número total de filhotes.

Comportamento Maternal:

Para todos os dados relacionados ao comportamento maternal, o número de animais por grupo são:

- Grupo Controle: 12 animais;
- Grupo Estresse Pré-Natal: 12 animais;

- Grupo Estresse Pós-Natal: 11 animais;
- Grupo Estresse Pré + Pós-Natal: 12 animais.

Os comportamentos analisados foram: construção de ninho, amamentação, interação com os filhotes, mãe no ninho sem posição de amamentação, número de lambidas e permanência da mãe fora do ninho.

Os parâmetros analisado para cada um dos comportamentos foram as frequências de realizações dos mesmos.

Os gráficos estão expressos em médias \pm erros médios padrões. O nível de significância aceito foi de $p < 0.05$.

Não se observou diferença na média semanal de frequência de construção do ninho [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=2.221$; $p=0.0994$ – Figura 12], na média semanal de frequência de amamentação [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=0.6832$; $p=0.5672$ – Figura 13], na média semanal de frequência de interação com os filhotes [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=1.169$; $p=0.3327$ – Figura 14], na média semanal de frequência de mãe no ninho sem posição de amamentação [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=0.0853$; $p=0.0853$ – Figura 15], na média semanal de frequências de lambidas [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=1.583$; $p=0.2073$ – Figura 16] e na média semanal de permanência fora do ninho [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=0.8330$; $p=0.4831$ – Figura 17] entre o grupo controle e os grupos tratados.

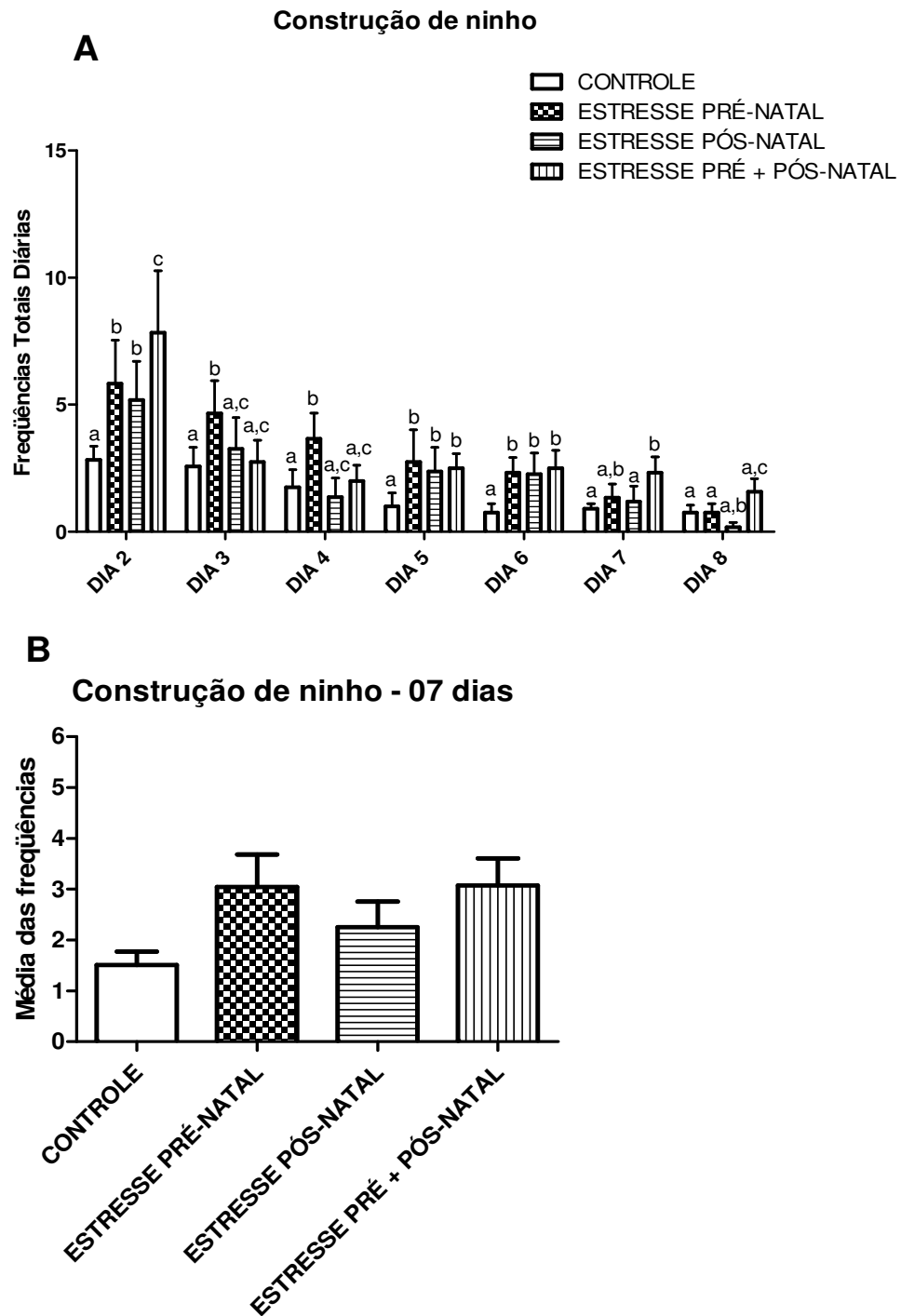


Figura 12. Construção do ninho. **A.** Frequências totais diárias de construção do ninho. **B.** Médias semanais de construção do ninho. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos em cada um dos dias ($p < 0.05$).

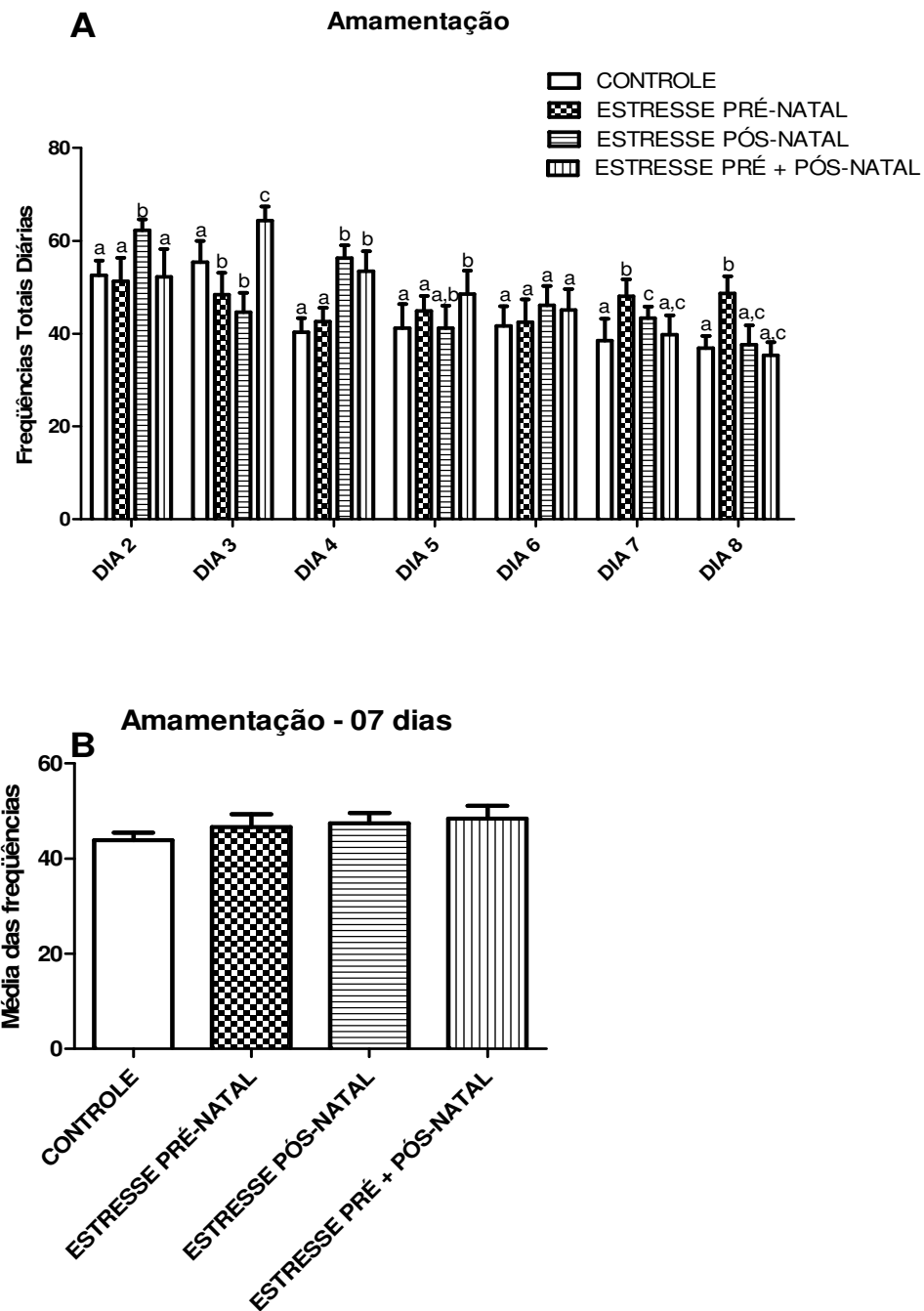


Figura 13. Amamentação. **A.** Frequências totais diárias de amamentação. **B.** Médias semanais de amamentação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos em cada um dos dias ($p < 0.05$).

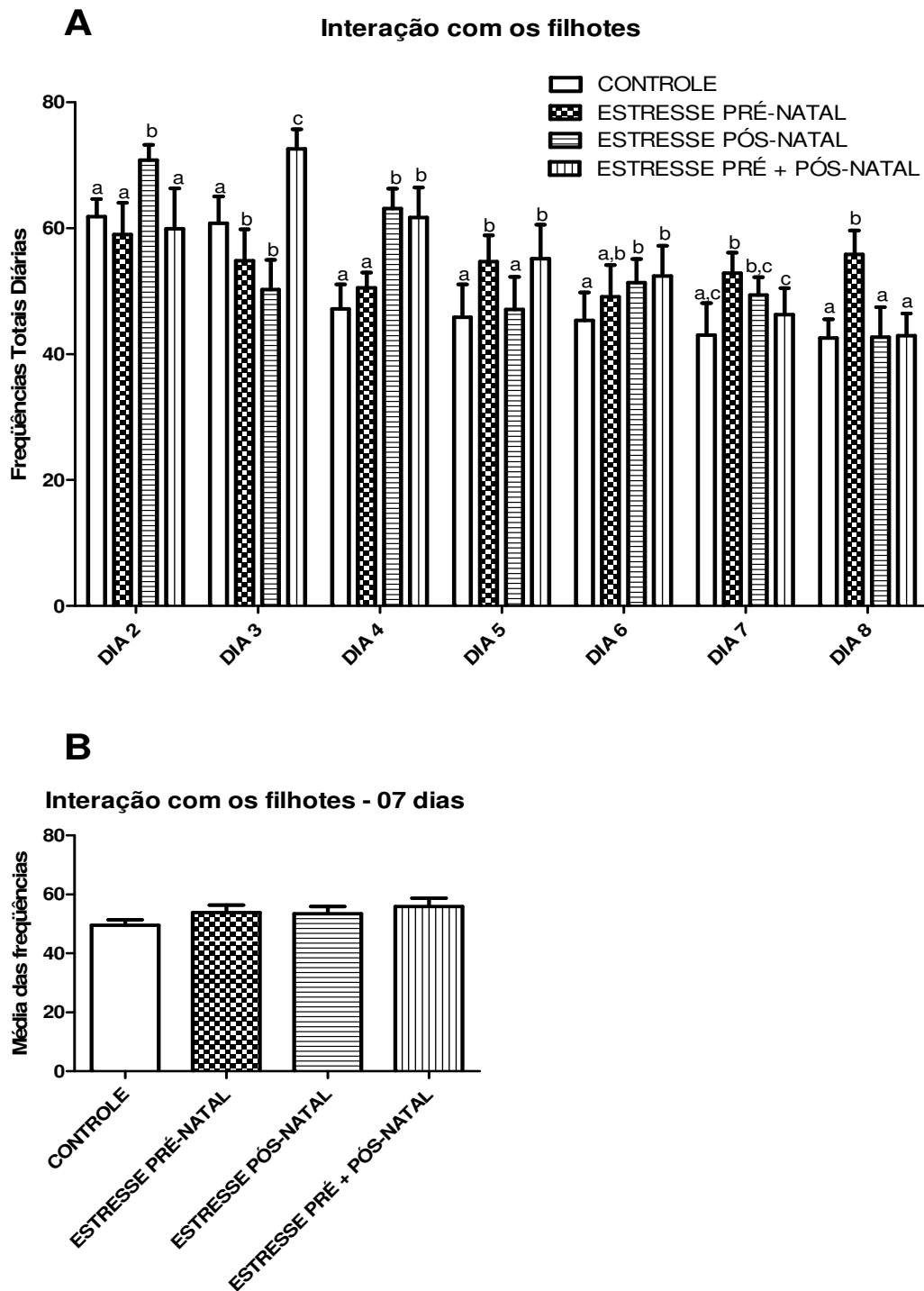


Figura 14. Interação com os filhotes. **A.** Frequências totais diárias de interação com os filhotes. **B.** Médias semanais de frequências de interação com os filhotes. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos em cada um dos dias ($p < 0.05$).

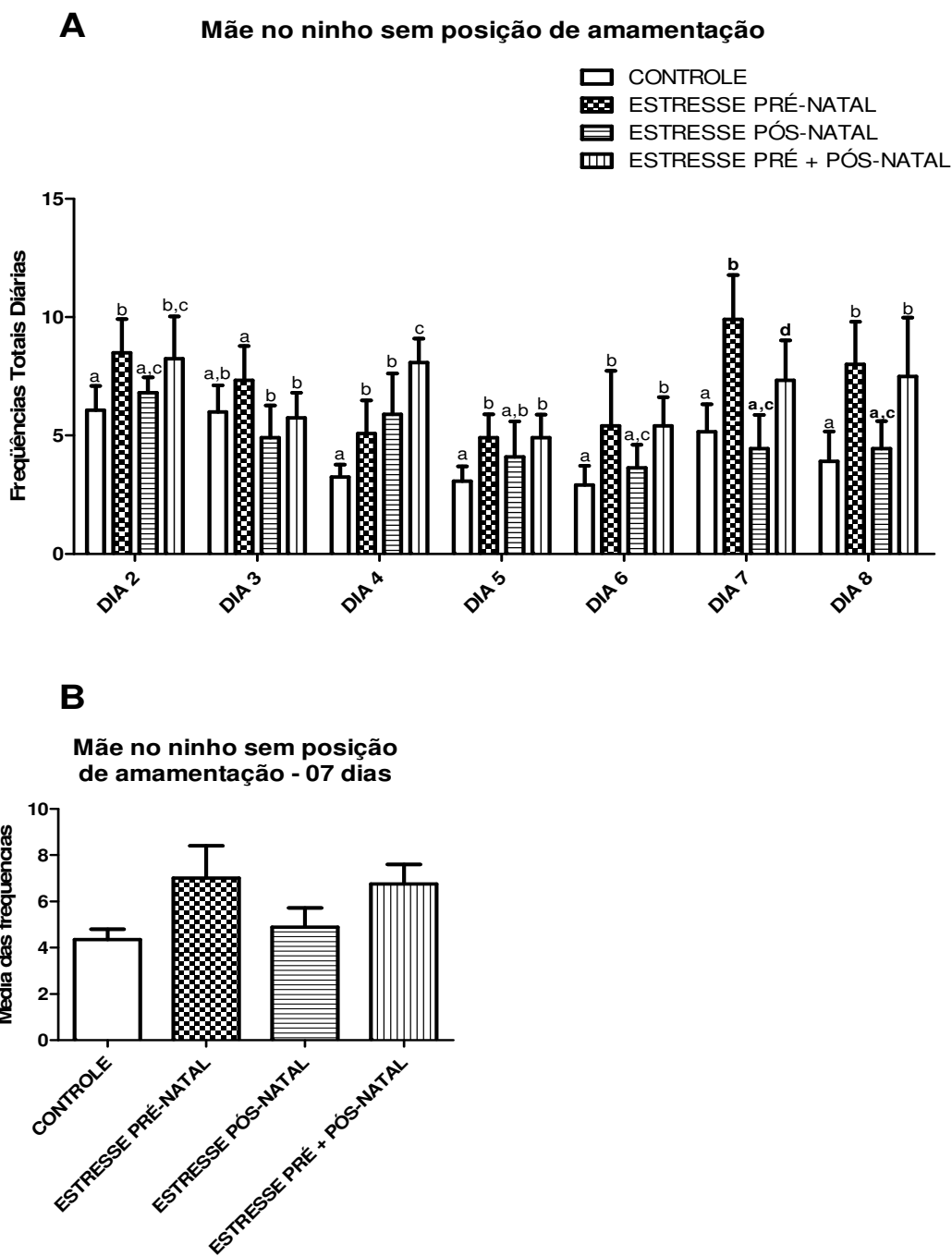


Figura 15. Mãe no ninho sem posição de amamentação. **A.** Frequências totais diárias de mãe no ninho sem posição de amamentação. **B.** Médias semanais de mãe no ninho sem posição de amamentação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos em cada um dos dias ($p < 0.05$).

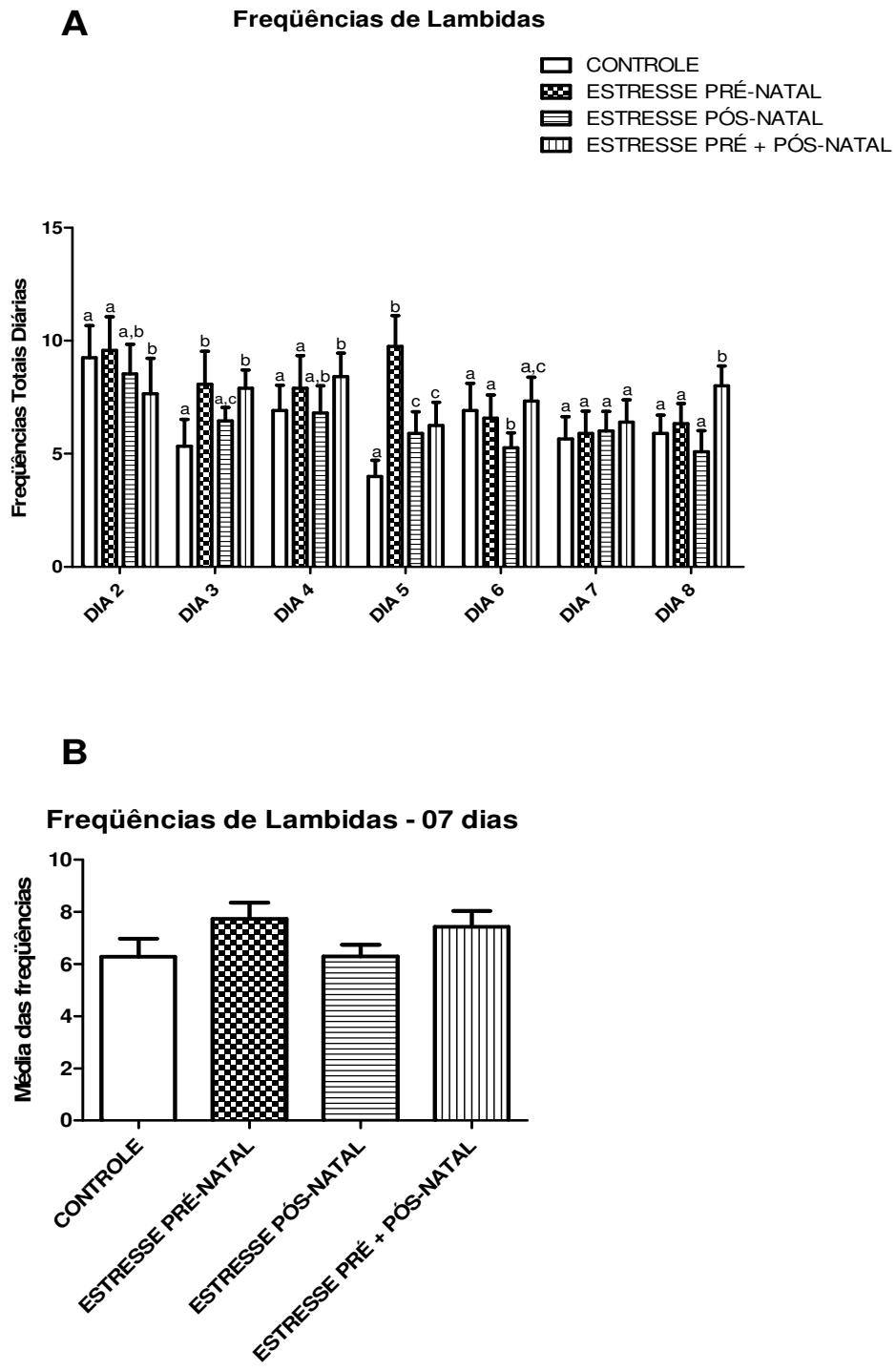


Figura 16. Freqüências de lambdas. **A.** Freqüências totais diárias de lambdas. **B.** Médias semanais de lambdas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos em cada um dos dias ($p < 0.05$).

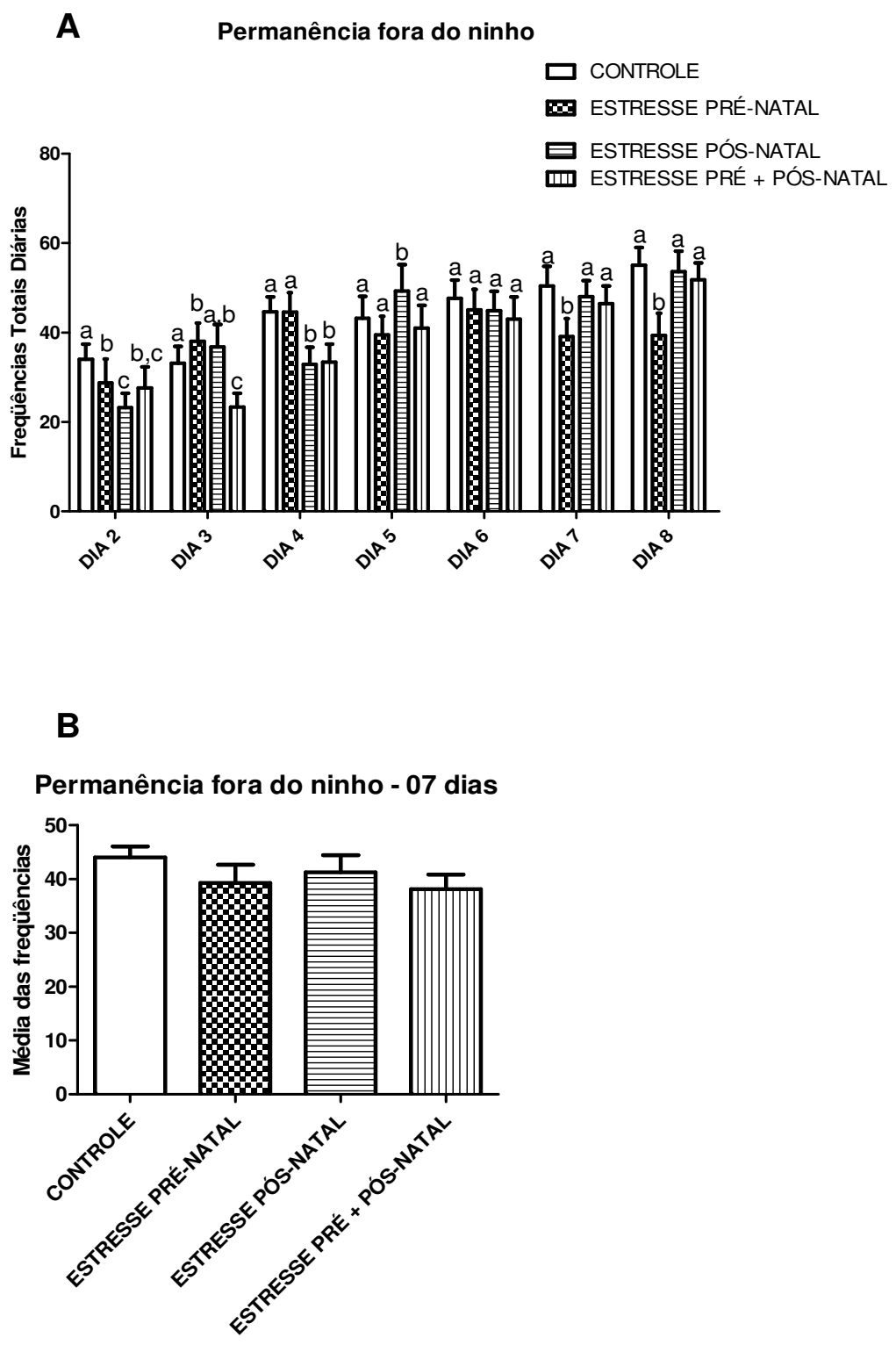


Figura 17. Permanência fora do ninho. **A.** Frequências totais diárias de permanência fora do ninho. **B.** Médias semanais de permanência fora do ninho. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos em cada um dos dias ($p < 0.05$).

Comportamento Agressivo Maternal

Para todos os dados relacionados ao teste de comportamento agressivo maternal, o número de animais por grupo são:

- Grupo Controle: 13 animais;
- Grupo Estresse Pré-Natal: 13 animais;
- Grupo Estresse Pós-Natal: 09 animais;
- Grupo Estresse Pré + Pós-Natal: 13 animais.

Os comportamentos analisados foram: postura agressiva, investigação social, interação com os filhotes, mobilidade, *rearing*, *grooming*, ataque frontal, ataque lateral, morder a cabeça do intruso, morder o corpo do intruso e imobilidade.

Os parâmetros analisados para cada comportamento foram: latências, frequências e porcentagem de tempo.

Os gráficos estão expressos em médias \pm erros médios padrões. O nível de significância aceito foi de $p < 0.05$.

Postura agressiva:

O grupo estresse pós-natal apresentou uma latência de postura agressiva significativamente maior que o grupo estresse pré + pós-natal [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=2.446$; $p < 0.05$ – Figura 18 A]. Não se observou diferença na frequência de postura agressiva [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=1.794$; $p=0.1623$ – Figura 18 B] e na porcentagem de tempo de postura agressiva [efeito fator

ESTRESSE; $F(3,44)=1.025$; $p=0.3909$ – Figura 18 C] entre os grupos estressados e o grupo controle.

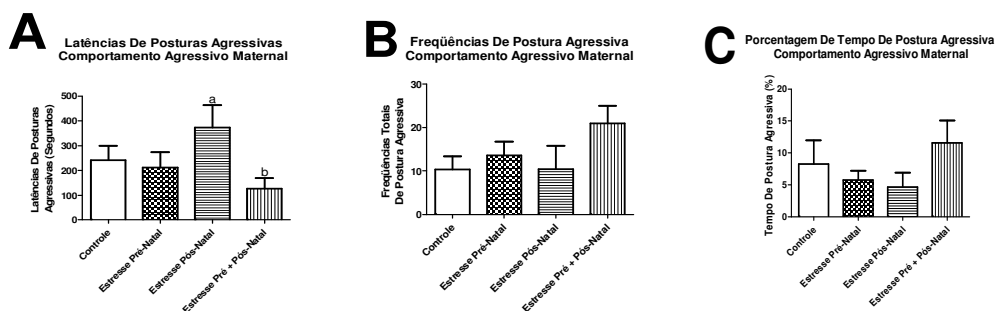


Figura 18. Postura agressiva. **A.** Latências de postura agressiva. **B.** Freqüências de postura agressiva. **C.** Porcentagens de tempo de postura agressiva. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos em cada um dos dias ($p<0.05$).

Investigação Social:

Os grupos estresse pré-natal e estresse pré+pós-natal apresentaram uma menor porcentagem de tempo de investigação social quando comparados ao grupo controle [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)= 3.084$; $p=0.1193$. – Figura 19 C]. Não se observou diferença na latência de investigação social [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=0.7424$; $p=0.5326$ – Figura 19 A] e na freqüência de investigação social [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=1.704$; $p=0.1801$ – Figura 19 B] entre os grupos estressados e o grupo controle.



Figura 19. Investigação Social. **A.** Latências de investigação social. **B.** Frequências de investigação social. **C.** Porcentagens de tempo de investigação social. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

Interação com os filhotes:

O grupo estresse pós-natal apresentou uma maior porcentagem de tempo de interação com os filhotes quando comparado aos outros grupos experimentais [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=3.409$; $p=0.0256$. – Figura 20 C]. Não se observou diferença na latência de interação com os filhotes [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=2.080$; $p=0.1165$ – Figura 20 A] e na frequência de interação com os filhotes [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=2.056$; $p=0.1199$ – Figura 20 B] entre os grupos estressados e o grupo controle.

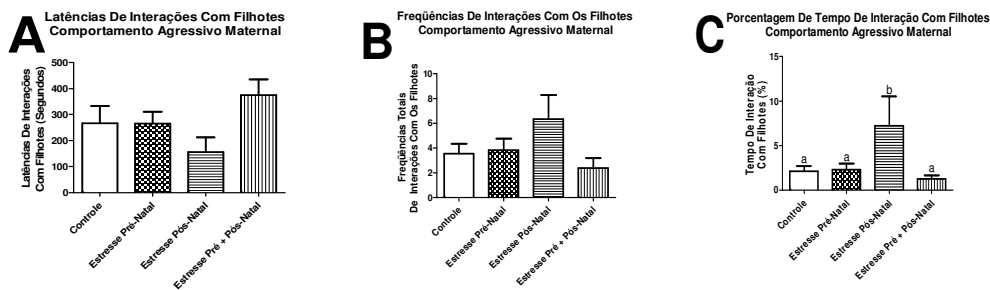


Figura 20. Interação com os filhotes. **A.** Latências de interação com os filhotes. **B.** Freqüências de interação com os filhotes. **C.** Porcentagens de tempo de interação com os filhotes. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

Mobilidade:

O grupo estresse pré + pós-natal apresentou uma maior porcentagem de tempo de movimentação que o grupo estresse pós-natal [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=2.880$; $p < 0.05$ – Figura 21 C]. Não se observou diferença na latência de movimentação [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=0.5050$; $p = 0.6809$ – Figura 21 A] e na freqüência de movimentação [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=0.4667$; $p = 0.7070$ – Figura 21 B] entre os grupos estressados e o grupo controle.

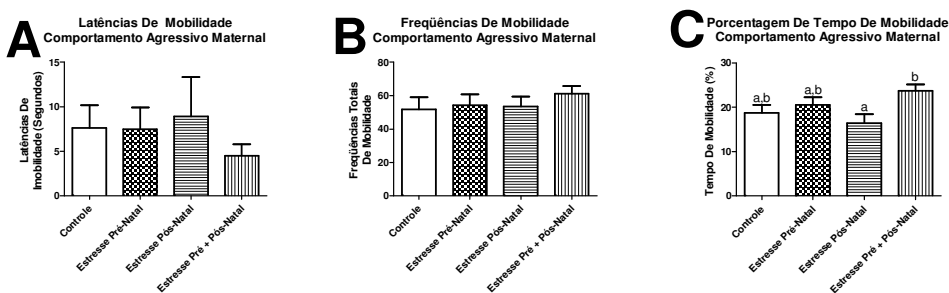


Figura 21. Mobilidade. **A.** Latências. **B.** Freqüências. **C.** Porcentagens de tempo de mobilidade. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

Rearing:

Não se observou diferença na latência de *rearing* [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=0.3733$; $p= 0.7727$ – Figura 22 A], na freqüência de *rearing* [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=0.6579$; $p=0.5824$ – Figura 22 B] e na porcentagem de tempo de *rearing* [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=0.8847$; $p=0.4565$ – Figura 22 C] entre os grupos estressados e o grupo controle.

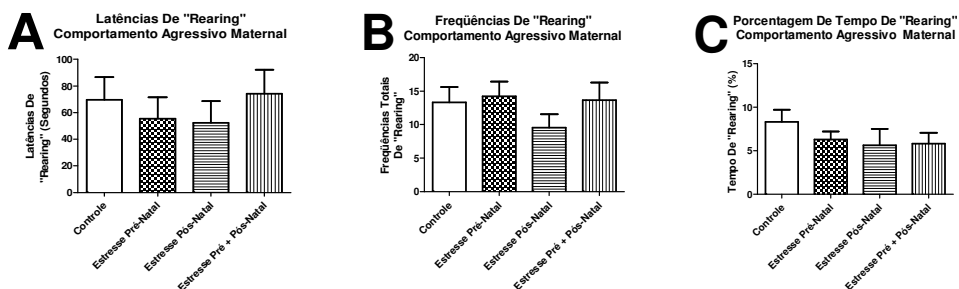


Figura 22. *Rearing*. **A.** Latências de *rearing*. **B.** Freqüências de *rearing*. **C.** Porcentagens de tempo de *rearing*.

Grooming:

Não se observou diferença na latência de *grooming* [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=1.044$; $p= 0.3825$ – Figura 23 A], na freqüência de *grooming* [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=0.9026$; $p= 0.4475$ – figura 23 B] e na porcentagem de tempo de *grooming* [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=0.3966$; $p= 0.7561$ – Figura 23 C] entre os grupos estressados e o grupo controle.

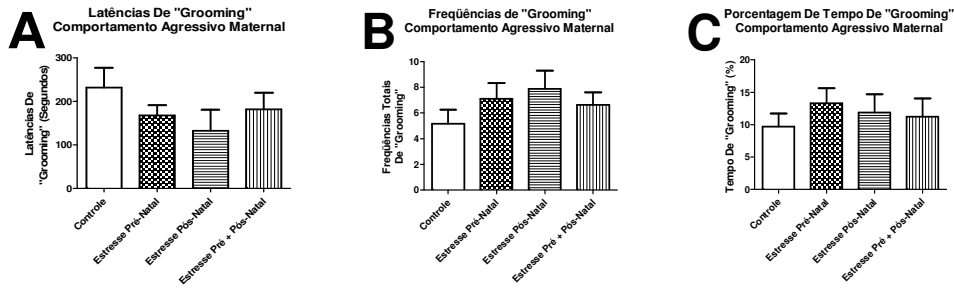


Figura 23. *Grooming*. **A.** Latências de *grooming*. **B.** Frequências de *grooming*. **C.** Porcentagens de tempo de *grooming*.

Ataque frontal:

Não se observou diferença na latência de ataque frontal [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=1.799$; $p=0.1613$ – Figura 24 A], na frequência de ataque frontal [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=0.8589$; $p=0.4695$ – Figura 24 B] e na porcentagem de tempo de ataque frontal [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=1.429$; $p=0.2471$ – Figura 24 C] entre os grupos estressados e o grupo controle.

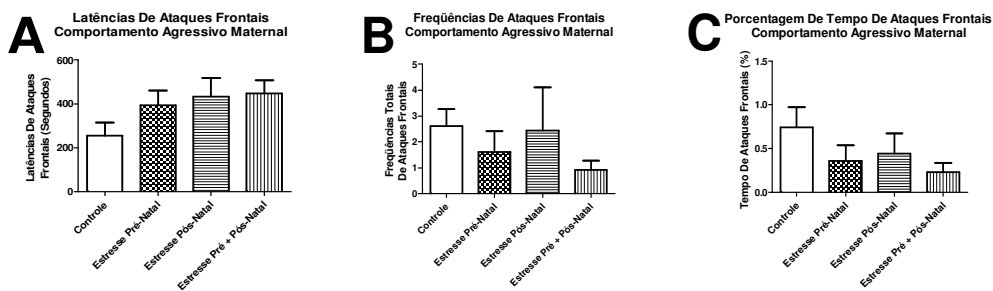


Figura 24. Ataque frontal. **A.** Latências de ataque frontal. **B.** Frequências de ataque frontal. **C.** Porcentagens de tempo de frontal.

Ataque lateral:

Não se observou diferença na latência de ataque lateral [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=2.191$; $p=0.1026$ – Figura 25 A], na frequência de ataque lateral [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=0.6252$; $p=0.6025$ – Figura 25 B] e na porcentagem de tempo de ataque lateral [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=0.8457$; $p=0.4763$ – Figura 25 C] entre os grupos estressados e o grupo controle.

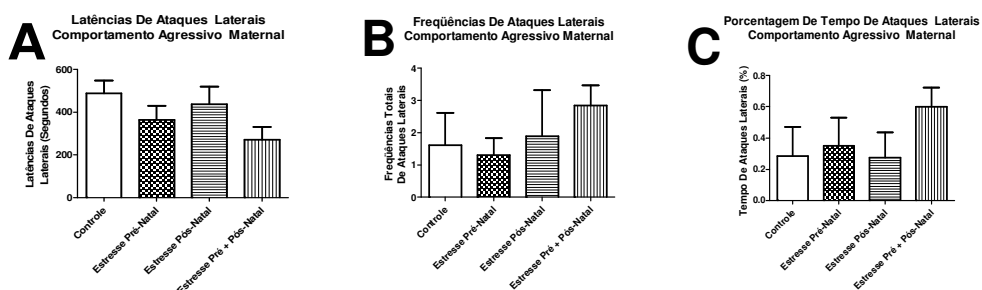


Figura 25. Ataque lateral. **A.** Latências de ataque lateral. **B.** Frequências de ataque lateral. **C.** Porcentagens de tempo de ataque lateral.

Morder a cabeça do intruso:

Não se observou diferença na latência [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=1.979$; $p=0.1310$ – Figura 26 A], na frequência [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=1.196$; $p=0.3224$ – Figura 26 B] e na porcentagem de tempo [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=2.250$; $p=0.0958$ – Figura 26 C] de morder a cabeça do intruso entre os grupos estressados e o grupo controle.

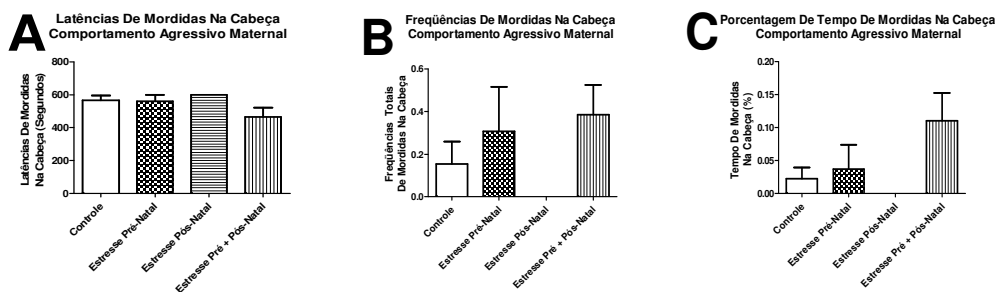


Figura 26. Morder a cabeça do intruso. **A.** Latências de morder a cabeça do intruso. **B.** Frequências de morder a cabeça do intruso. **C.** Porcentagens de tempo de morder a cabeça do intruso.

Morder o corpo do intruso:

Não se observou diferença na latência [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=0.7402$; $p=0.5338$ – Figura 27 A], na frequência [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=0.3456$; $p=0.7925$ – Figura 27 B] e na porcentagem de tempo [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=0.8037$; $p=0.4986$ – Figura 27 C] de morder o corpo do intruso entre os grupos estressados e o grupo controle.

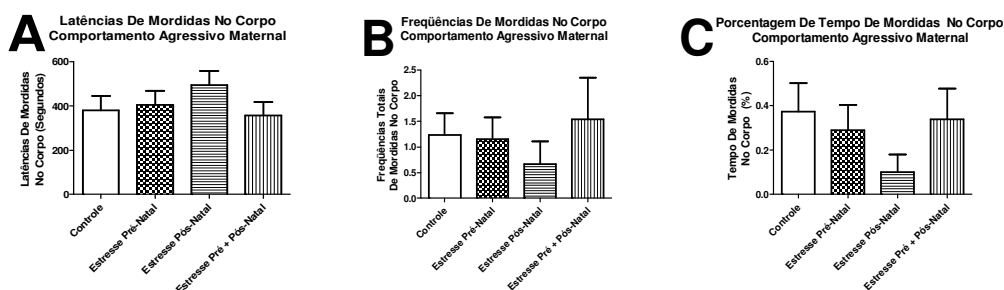


Figura 27. Morder o corpo do intruso. **A.** Latências de morder o corpo do intruso. **B.** Frequências de morder o corpo do intruso. **C.** Porcentagens de tempo de morder o corpo do intruso.

Imobilidade:

Não se observou diferença na latência [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=1.451$; $p=0.2409$ – Figura 28 A], na frequência [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=1.352$; $p=0.2698$ – Figura 28 B] e na porcentagem de tempo [efeito fator ESTRESSE; $F(3,44)=0.9392$; $p=0.4299$ – Figura 28 C] de imobilidade entre os grupos estressados e o grupo controle.

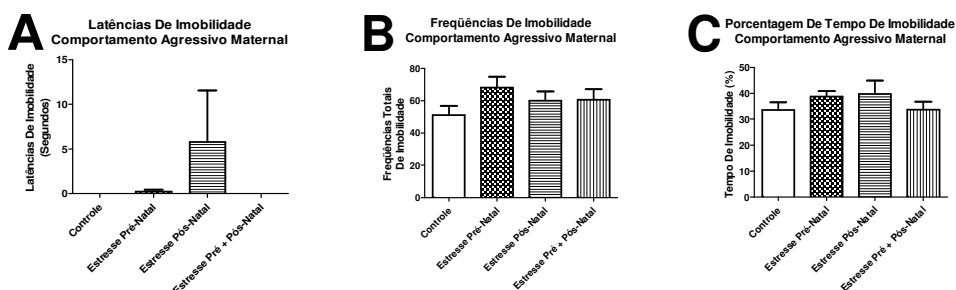


Figura 28. Imobilidade. **A.** Latências de imobilidade. **B.** Frequências de imobilidade. **C.** Porcentagens de tempo de imobilidade.

Teste Agudo de Nado Forçado

Para todos os dados relacionados ao teste agudo de nado forçado, o número de animais por grupo são:

- Grupo Controle: 14 animais;
- Grupo Estresse Pré-Natal: 10 animais;
- Grupo Estresse Pós-Natal: 09 animais;
- Grupo Estresse Pré + Pós-Natal: 14 animais.

Os comportamentos analisados foram: mobilidade, imobilidade e *climbing*.

Os parâmetros analisados para cada comportamento foram: freqüências totais, latências, porcentagens de tempo e porcentagens de freqüências.

Os gráficos estão expressos em médias \pm erros médios padrões. O nível de significância aceito foi de $p < 0.05$.

Não se observaram diferenças significativas nas freqüências totais [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=0.2113$; $p=0.8880$ – Figura 29 A], nas latências [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=0.9414$; $p=0.4290$ – Figura 29 B], nas porcentagens de tempo [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=0.1357$; $p=0.9382$ – Figura 29 C] e nas porcentagens de freqüências totais [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=0.6449$; $p=0.4032$ – Figura 29 D] de movimentação entre os grupos estressados e o grupo controle.

Não se observaram diferenças significativas nas freqüências totais [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=0.3631$; $p=0.7799$ – Figura 29 A], nas latências [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=0.7522$; $p=0.5271$ – Figura 29 B], nas porcentagens de tempo [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=0.2289$; $p=0.8758$ – Figura 29 C] e nas porcentagens de freqüências totais [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=1.361$; $p=0.2805$ – Figura 29 D] de imobilidade entre os grupos estressados e o grupo controle.

Não se observaram diferenças significativas nas freqüências totais [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=0.2234$; $p=0.8796$ – Figura 29 A], nas latências [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=0.5382$; $p=0.6587$ – Figura 29 B], nas porcentagens de tempo [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=0.7627$; $p=0.5212$ – Figura 29 C] e nas porcentagens de freqüências totais [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=1.499$; $p=0.2283$ – Figura 29 D] de *climbing* entre os grupos estressados e o grupo controle.

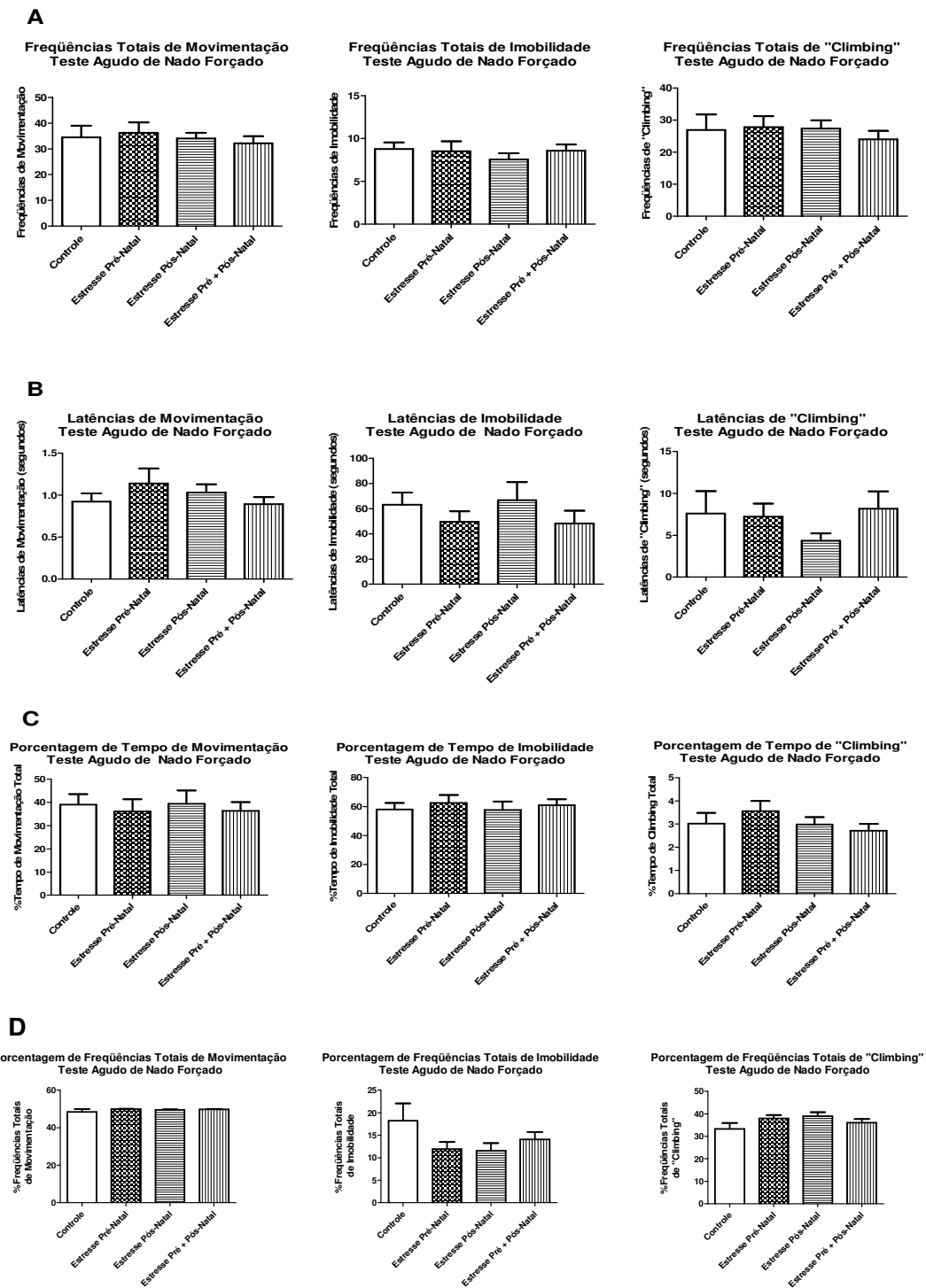


Figura 29. Teste agudo de nado forçado. **A.** Freqüências totais de movimentação, imobilidade e *climbing*. **B.** Latências de movimentação, imobilidade e *climbing*. **C.** Porcentagens de tempo de movimentação, imobilidade e *climbing*. **D.** Porcentagens de freqüências totais de movimentação, imobilidade e *climbing*.

Labirinto em Cruz Elevado

Para todos os dados relacionados ao teste de labirinto em cruz elevado, o número de animais por grupo são:

- Grupo Controle: 12 animais;
- Grupo Estresse Pré-Natal: 10 animais;
- Grupo Estresse Pós-Natal: 09 animais;
- Grupo Estresse Pré + Pós-Natal: 11 animais.

Os comportamentos analisados foram: permanência nos braços abertos, permanência nos braços fechados, número de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados.

Os parâmetros analisados para cada comportamento foram: porcentagens de permanências nos braços abertos e fechados, e porcentagens de freqüências de entradas nos braços abertos e fechados.

Os gráficos estão expressos em médias \pm erros médios padrões. O nível de significância aceito foi de $p < 0.05$.

Não se observaram diferenças significativas nas porcentagens de permanência [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=1.267$; $p=1.267$ – Figura 30 A] e de freqüências de entradas [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=0.5754$; $p=0.6347$ – Figura 30 C] nos braços abertos entre os grupos estressados e o grupo controle.

Não se observaram diferenças significativas nas porcentagens de permanência [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=2.161$; $p=0.1086$ – Figura 30 B] e de

freqüências de entradas [efeito fator ESTRESSE; $F(3,43)=0.9042$; $p=0.4481$ – Figura 30 D] nos braços fechados entre os grupos estressados e o grupo controle.

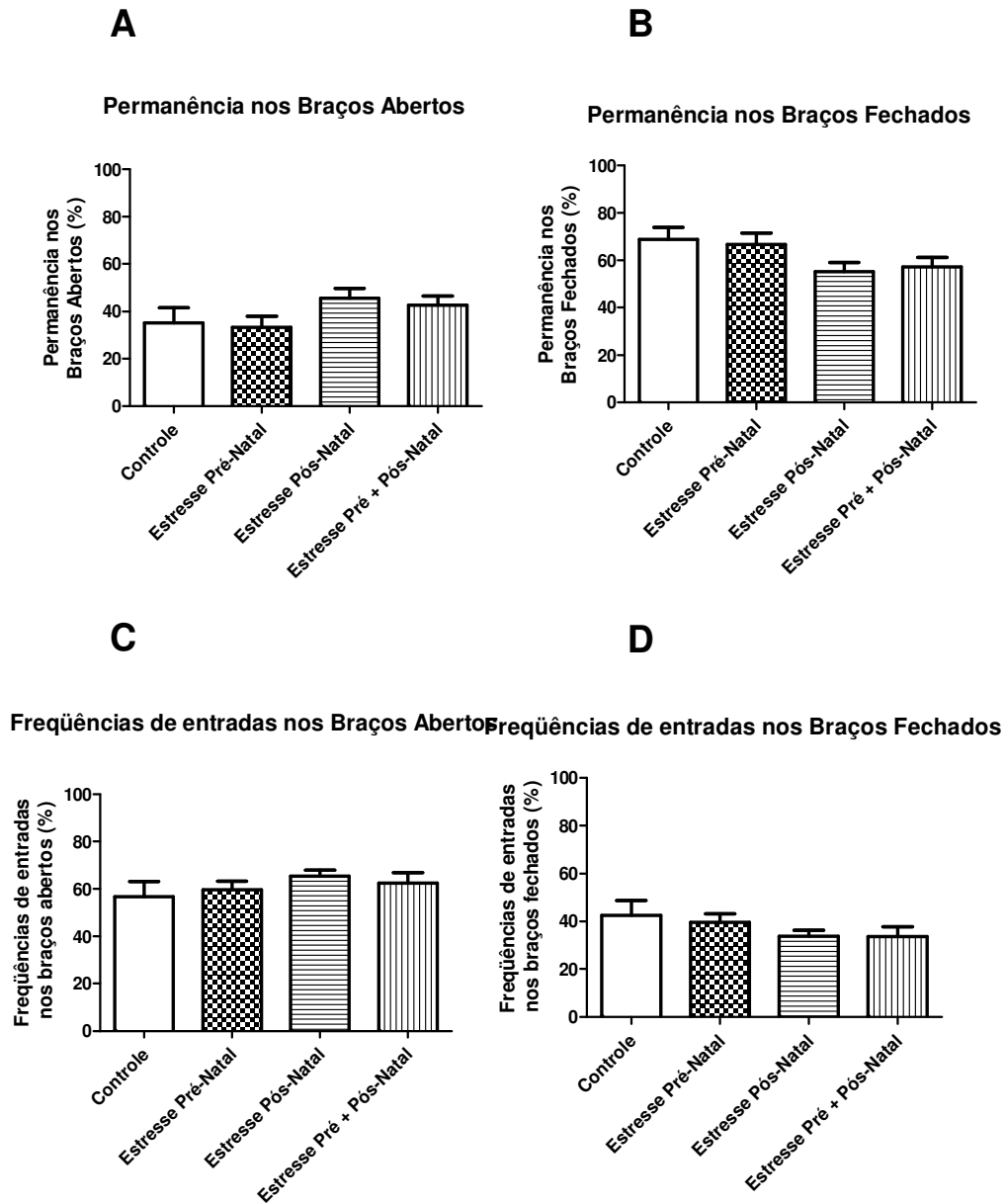


Figura 30. Teste de labirinto em cruz elevado. **A.** Porcentagem de permanência nos braços abertos. $F = 1.267$. **B.** Porcentagem de permanência nos braços fechados. $F = 2.161$. **C.** Porcentagem de freqüência de entradas nos braços abertos. $F = 0.5754$. **D.** Porcentagem de freqüências de entradas nos braços fechados. $F = 0.9042$.

Discussão

O presente trabalho teve por objetivo analisar diferentes intervenções ambientais, através da restrição de substrato para a construção do ninho e da apresentação a um predador natural (um gato) no primeiro dia pós-natal, que pudessem interferir na relação mãe-filhote. Buscamos entender se as alterações que ocorrem nesta relação são devidas aos estímulos ambientais durante a gestação, durante o período de lactação ou até mesmo por uma ruptura no convívio do ambiente neonatal como um todo.

Liu e colaboradores (2000) e Champagne e colaboradores (2003) demonstraram que ocorrem naturalmente, sem nenhuma intervenção externa, diferenças individuais do comportamento maternal em ratos. Mães mais cuidadosas apresentam um aumento no comportamento de lambar os filhotes e de amamentação com dorso arqueado em relação a mães menos cuidadosas. Uma característica importante deste achado é o fato de que o cuidado maternal (em especial, o número de lambidas) se distribui de forma normal na população de ratas, como numa curva de Gauss.

Os resultados do presente estudo vão ao encontro dos resultados de Schelstraete *et al.* (1992), no qual os autores demonstraram características sobre o padrão natural de ritmicidade do comportamento maternal de ratas, sendo que estas apresentam um maior cuidado com sua ninhada nos primeiros dias pós-natais mas,

ao longo dos dias, este diminui paulatinamente, enquanto que o comportamento de permanência fora do ninho é aumentado.

Ao analisar os resultados obtidos no presente estudo, podem-se observar alterações pontuais no comportamento das mães para com seus filhotes, sendo que, ao longo de cada dia de observação, os grupos apresentaram padrões diferenciados de comportamentos. Fato este importante, pois a programação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal pelo cuidado materno (demetilação do lócus do promotor do receptor de glicocorticóide – GR - no hipocampo leva a uma maior expressão de GR nessa área e, portanto, maior retroalimentação negativa e menor resposta ao estresse de forma persistente) ocorre num ponto específico do período perinatal (entre os dias 3 e 4 pós-natal) (Weaver *et al.*, 2004). Logo, se o cuidado for diferente especialmente nesse período, pode ser que este efeito afete de forma persistente os filhotes. É interessante notar que o estresse pré-natal afeta a amamentação (anexo D) e o número de lambidas (anexo J) especialmente nestes dias, o que evidencia a importância de estudos mais detalhados dos efeitos destes agentes estressores em longo prazo nos filhotes.

Essas flutuações ao longo dos dias para cada um dos comportamentos, por sua vez, não ocasionaram diferenças estatísticas significativas quando comparados os valores das médias de cada comportamento durante todo o período de observação entre todos os grupos em estudo.

Em modelos animais, a aplicação de certos tipos de eventos estressores durante o período gestacional pode resultar em aumento nas taxas de abortos, em uma menor quantidade de filhotes ou mesmo em uma diminuição do tamanho dos mesmos, acompanhado de aumento de sua mortalidade (Runner, 1959; Euker *et al.*, 1973; Wildt *et al.*, 1975; Salgado *et al.*, 1977; Herrenkohl, 1979; Pollard, 1984; De

Catanzaro, 1988). No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas entre o número total de filhotes dos grupos estressados pré-natalmente, quando comparados aos grupos controles.

Patin *et al.* (2002) demonstraram que a apresentação de um predador natural a ratas durante o período gestacional ocasionou, além de aumentos nas concentrações plasmáticas de corticosterona, uma alteração do padrão de comportamento maternal destas durante o período pós-natal. Mães estressadas apresentavam diminuição do cuidado para com os seus filhotes e aumentavam os comportamentos de auto-cuidado, quando comparadas às mães controle.

Alguns autores (Maccari *et al.*, 1995; Melniczek & Ward, 1994; Moore & Power, 1986) relataram que o estresse gestacional prejudica o comportamento maternal e que isso poderia influenciar a função do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) da prole e seus comportamentos.

Moore & Poder (1986) relataram que mães estressadas passavam menor tempo lambendo filhotes adotivos de mães não-estressadas. Interessantemente, eles também demonstraram neste trabalho que os filhotes estressados solicitavam menor cuidado (lambidas) para suas mães adotivas não-estressadas.

Smith *et al.* (2004) demonstraram que o estresse gestacional induz um estado de depressão pós-natal em ratas fêmeas, que exibem comportamentos menos freqüentes e menos intensos de cuidados maternos.

Estes e outros dados suportam a idéia de que os padrões comportamentais tanto de mães quanto de filhotes podem ser suprimidos pelo estresse gestacional, ocasionando possivelmente uma interrupção da sinalização mãe-filhote.

Entretanto, os dados do presente trabalho relacionados ao cuidado maternal apóiam os estudos de Poltyrev & Weinstock, 2005; Pardon *et al.*, 2000 e Fameli *et*

al., 1995, nos quais o estresse durante o período gestacional ou perinatal não ocasionou alterações sobre o comportamento materno, levando em consideração as médias semanais de cada um dos constituintes comportamentais.

Essas divergências nos resultados descritos acima, juntamente com os deste trabalho, poderiam ser explicadas devido às diferenças dos protocolos de estresses pré e/ou pós-natais utilizados. A capacidade de um estresse para alterar o comportamento materno pode variar entre linhagens de ratos e, até mesmo, entre indivíduos de uma mesma espécie. Além disso, diferentes protocolos de análise do comportamento materno são aplicados, o que possibilitaria obter resultados conflitantes entre cada método de análise específico.

Segundo Baker *et al.*, 2008, a variabilidade do protocolo de estresse também poderia alterar o resultado; de particular importância, o tempo entre o final de uma exposição ao estresse e o parto (um maior atraso de tempo de aplicação de estresse poderia diminuir o impacto sobre o comportamento materno) e a gravidade do procedimento de estresse. Esse último ponto, podendo ser afetado por inúmeras variáveis, como, tipo de estressor, duração da exposição de estresse ou período durante a gestação, e se o procedimento de estresse protege contra a antecipação e a habituação ao mesmo.

Seguindo esta linha de raciocínio, poderíamos inferir que ratas submetidas ao estresse pré-natal (restrição de substrato) poderiam se habituar a tais condições, o que não afetaria ou comprometeria sua resposta comportamental para com sua ninhada. Também poderíamos especular uma hipótese alternativa de que esta forma de estresse pré-natal não veio a ser um evento de grande impacto sobre a fisiologia gestacional materna, visto que o número de filhotes totais paridos não foi alterado.

Concomitantemente ao padrão de comportamento maternal, as ratas lactantes exibem uma diminuição dos níveis de ansiedade em testes de conflito (Ferreira et al., 1989), no paradigma de campo-aberto (Fleming & Luebke, 1981) e no teste de labirinto em cruz elevado (Bitran et al., 1991; Lonstein et al., 1998; Lonstein et al., 1999; Pereira et al., 2005), exibe menor medo em direção a um estímulo sonoro (Ferreira et al., 2002; Hård & Hensen, 1985) e desenvolve um comportamento de agressividade quando dispostas perante intrusos.

Ferreira e colaboradores (2002) relataram que ratas lactantes, quando comparadas a ratas sensibilizadas a desenvolver comportamento maternal ou a ratas ovariectomizadas, apresentavam maior índice de agressividade a um intruso.

Os resultados do presente trabalho demonstraram não haver diferenças significativas em grande parte dos parâmetros estudados do comportamento de agressividade maternal. Os grupos que foram submetidos aos paradigmas estressores pré-natal e pré + pós-natal apresentaram uma diminuição da porcentagem de tempo de investigação social, quando comparados aos outros grupos de estudo.

O grupo estressado pós-natalmente apresentou um aumento da porcentagem de tempo de interação com os filhotes, quando comparado aos outros grupos. Além disso, foi observado um aumento na porcentagem de mobilidade do grupo estressado pré+pós-natalmente, quando comparado aos outros grupos.

As freqüências e latências de todos os parâmetros analisados no comportamento agressivo maternal não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os quatro grupos.

Um dado curioso, conforme analisado, foi que os animais submetidos aos tratamentos estressores devidos (pré e/ou pós-natal) não apresentaram diferenças

do grupo controle nos comportamentos agressivos que se direcionam ao intruso. Entretanto, esses grupos apresentaram diferenças apenas no tempo total de investigação social, de interação com seus filhotes ou de movimentação.

As razões pelas quais ocorram estas disparidades entre os resultados do presente estudo e os resultados das fêmeas lactantes do trabalho de Ferreira e colaboradores (2002) poderiam ser, entre outras, pelas diferenças de durações dos testes de agressividades, pelas diferenças de idades dos animais utilizados, ou até mesmo, pela diferença de paradigmas aplicados em diferentes estados fisiológicos das fêmeas (por exemplo, gestação e lactação).

Smith e colaboradores (2004) demonstraram que mães de ratos expostas ao estresse durante a gestação tardia apresentaram maior tempo de imobilidade no teste agudo de nado forçado durante o período de lactação. Estes resultados sugerem que o estresse gestacional aumenta sintomas tipo-depressivos durante o período pós-natal. Entretanto, o efeito aparentemente é transitório e específico para o período de lactação, pois mães testadas após o desmame não apresentaram nenhum efeito, como relatados por Darnaudéry *et al*, 2004.

Ao contrário dos dados obtidos por Smith *et al.* (2004), não foram obtidas neste trabalho diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e estressados em qualquer parâmetro relacionado ao teste agudo de nado forçado, demonstrando que essas ratas submetidas a tais eventos estressores durante o período perinatal, não exibiram comportamentos tipo-depressivos.

Já os dados comportamentais obtidos pelo teste de labirinto em cruz elevado demonstraram também não haver diferenças significativas nas latências, nas freqüências, nos tempos totais, nas razões de freqüências e nas razões de tempos de permanência nos braços abertos e/ou fechados do aparato.

O labirinto em cruz elevado foi realizado após o teste agudo de nado forçado, fato este apontado por alguns autores como sendo um evento estressor aos ratos. De Mello (2007) demonstrou que animais submetidos ao teste agudo de nado forçado apresentavam níveis plasmáticos de ácidos graxos livres aumentados, além de concentrações plasmáticas de glicose e de corticosterona significativamente maiores que aqueles apresentados por grupos controles (animais não submetidos ao teste de nado).

Considerando que todos os grupos experimentais deste protocolo (controle e estressados) passaram pela mesma bateria de testes comportamentais propostos por este, podemos inferir baseados em tais resultados, que as ratas de todos os grupos não se tornaram mais ou menos ansiosas e que também não demonstraram maior ou menor atividade exploratória (medida pela razão de entradas nos braços abertos e fechados) no labirinto em cruz elevado. Também apoiado nestes resultados, podemos especular que o teste agudo de nado forçado, quando aplicado em ratas lactantes, possa não ser considerado um evento de grande efeito estressor ou capaz de induzir uma maior ansiogênese após sua realização.

Com os experimentos realizados no presente trabalho podemos concluir que os eventos estressores estudados não ocasionam alterações no comportamento maternal *per se*, mas alteram o padrão de comportamento da mãe para com seus filhotes. Além disso, eles também não alteram outros índices comportamentais maternos, como nível de agressividade, ansiedade ou atividade exploratória. Devemos considerar que estes comportamentos da mãe são muito importantes, mas existem outros fatores que parecem ser decisivos para estabelecimento dessa relação materno-filial como a própria presença de seus filhotes, o cheiro de sua ninhada, as vocalizações dos filhotes, o próprio ninho e outros fatores ambientais.

Entretanto, ainda é necessário investigar diferentes tempos de exposições a estes agentes estressores bem como exposições crônicas aos mesmos. Seria interessante também investigar o comportamento dos filhotes quando adultos, para determinar se estes estressores não apresentariam efeitos a longo prazo na ninhada, independentemente do comportamento maternal, assim como demonstrado por estudos de Kiaer *et al.*, 2010 e Baker *et al.*, 2009.

Conclusões

Os estresses aplicados neste protocolo durante o período perinatal – restrição de substrato durante o período pré-natal e apresentação a um predador natural (gato) no período pós-natal - não ocasionaram alterações significativas nos comportamentos relacionados ao cuidado maternal. Entretanto, as flutuações ao longo dos dias de observações de cada um destes foram alteradas, o que necessitaria de estudos mais aprofundados para ver qual seria a repercussão dessa diferenciação do padrão do comportamento maternal na vida adulta desses filhotes de mães submetidas aos paradigmas neste trabalho estudados.

O número de filhotes de mães pertencentes aos grupos estressados não foram diferentes estatisticamente das fêmeas do grupo controle, sugerindo que possivelmente o paradigma estressor pré-natal deste trabalho não apresente grande impacto sobre a fisiologia gestacional materna ou que estas mães submetidas à tal procedimento apresentaram um mecanismo de neuroproteção ou habituação a esta condição.

Além disso, não foram observados comportamentos tipo-depressivos (medidos pelo teste agudo de nado forçado), alterações do nível de ansiedade (medido pelo teste de labirinto em cruz elevado) ou do comportamento agressivo maternal (medido pelo teste de agressividade maternal frente a um intruso).

Perspectivas

Dosagens Hormonais

Como bem descrito na literatura, o hormônio corticosterona está diretamente relacionado com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e com as respostas aos eventos estressores. Estas respostas, em virtude do protocolo de estresse apresentado, podem se mostrar de maneira diferenciada do padrão regular. Portanto, este projeto necessita desta medição hormonal para tentar explicar possíveis alterações nos padrões de respostas aos eventos estressores aqui aplicados.

As dosagens dos hormônios corticosterona (CORT) e prolactina (PRL) plasmáticos nos permitirão, inicialmente, apontar se ambos os eventos estressores escolhidos para este protocolo ativam respostas fisiológicas via eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrena (HPA). Além disso, com estes dados também poderemos analisar se as concentrações basais de corticosterona e prolactina dos grupos estressados se encontram diferenciadas daquelas dos grupos controles.

Sabe-se atualmente que o hormônio ocitocina (OCT) atua ativamente de maneira central no Sistema Nervoso (SN) como um dos neuro-hormônios envolvidos no controle neural do comportamento maternal. Possivelmente, por uma

desestruturação do padrão comportamental por nós observado, a ocitocina possa estar alterada nos grupos submetidos aos estresses pré e/ou pós-natal.

Como o enfoque deste trabalho visa observar quais são os padrões das respostas dos animais frente aos eventos estressores, também necessitamos de análises do hormônio prolactina, pois alterações dos níveis de prolactina também são relacionadas com eventos desencadeados pelo estresse. Por fim, as análises dos níveis de ocitocina central (licórica) poderão estar relacionadas com os mecanismos de neuromodulações envolvidos no padrão de resposta do comportamento maternal.

As amostras para dosagens hormonais já foram coletadas. Estamos apenas aguardando a chegada do material radioativo para a técnica de radioimunoensaio a ser realizada no laboratório da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto – Faculdade de Medicina, com a colaboração do Professor Celso Franci.

Com estes dados das análises hormonais, poderemos explorar ainda melhor algumas conclusões de resultados obtidos neste trabalho.

Referências Bibliográficas

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

ALTEMUS, M.; DEUSTER, P. A.; GALLIVEN, E.; CARTER, C. S. & GOLD, P. Suppression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress in lactating women. **The Journal of Clinical Endocrinolog & Metabolism** 80 (1995): 2954-2959.

ANAND K. J. S. & SCALZO, F. M. Can adverse neonatal experience alter brain development and subsequent behavior? **Biology of the Neonate** 77 (2000): 69-82.

ARNSTEN, A. F. The biology of being frazzled. **Science** 280 (1998): 1711-1712.

BAKER, S.; CHEBLI, M.; REES, S.; LeMAREC, N.; GODBOUT, R. & BIELAJEW, C. Effets of gestational stress: 1. Evaluation of maternal and juvenile offspring behavior. **Brain Reseach** 1213 (2008): 98-110.

BAKER, S.; RESS, S.; CHEBLI, M.; LeMAREC, N; GODBOUT, R.; HUTA, V. & BIELAJEW, C. Effects of gestational stress: 2. Evaluation of male and female adult offspring. **Brain Research** 1302 (2009): 194-204.

BARLOW, S. M.; KNIGHT, A. F. & SULLIVAN, E. M. Delay in postnatal growth and development of offspring produced by maternal restraint stress during pregnancy in the rat. **Teratology** 18 (1978): 211-218.

BECKER, G. & KOWALL, M. Crucial role of the postnatal maternal environment in the expression of prenatal stress effects in the male rats. **Journal of Comparative & Physiological Psychology** 91 (1977): 1432-1446.

BENNETT, H. A.; EINARSON, A.; TADDIO, A.; KOREN, G. & EINARSON, T. R. Prevalence of depression during pregnancy: Systematic Review. **Obstetrics & Gynecology** 103 (2004): 698-709.

BITRAN, D.; HILVERS, R. J. & KELLOGG, C. K. Ovarian endocrine status modulates the anxiolytic potency of diazepam and the efficacy of aminobutyric acid-benzodiazepine receptor-mediated chloride ion transport. **Behavioral Neuroscience** 105 (1991): 653-662.

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

BYRNES, E. M. & BRIDGES, R. S. Reproductive experience alters anxiety-like behavior in the female rat. **Hormones and Behavior** 50 (2006): 70-76.

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

CARTER, D. A. & LIGHTMAN, S. L. Oxytocin responses to stress in lactating and hyperprolactinaemic rats. **Neuroendocrinology** 46 (1987): 532-537.

CALDJI, C.; TANNENBAUM, B.; SHARMA, S.; FRANCIS, D.; PLOTSKY, P. M. & MEANEY, M. J. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of behavioral fearfulness in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 95 (1998): 5335-5340.

CALDJI, C.; LIU, D.; SHARMA, S.; DIORIO, J.; FRANCIS, D.; MEANEY, M. J. & PLOTSKY, P. M. Development of individual differences in behavioral and endocrine responses to stress: Role of the postnatal environment. In: MeEWAN, B. S. editor. **Handbook of physiology: coping with environment**. New York: Oxford Univ Press, 2001. pp. 271-292.

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

DARNAUDÉRY, M. & MACCARI, S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. **Brain Research Reviews** 57 (2008): 571-585.

DARNAUDÉRY, M.; DUTRIEZ, I.; VILLART, O.; MORLEY-FLETCHER, S. & MACCARI, S. Stress during gestation induces lasting effects on emotional reactivity of the dam. **Behavioural Brain Research** 153 (2004): 211–216.

DE CATANZARO, D. Effect of predator exposure upon early pregnancy in mice. **Physiology & Behavior** 43 (1988): 691-696.

DE MELLO, D. M. S. Marcadores bioquímicos da ansiedade e do estresse. Envolvimento do receptor neurocinérgico NK1. Tese de Doutorado (2007). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC – Brasil.

DOUGLAS, A. J. & RUSSELL, J. A. Corticotrophin-releasing hormone, proenkephalin A and oxytocin mRNAs in the paraventricular nucleus during pregnancy and parturition in the rat. **Gene Therapy** 1 (Suppl.) (1994):S85.

DOUGLAS, A. J. & RUSSELL, J. A. Endogenous opioid regulation of oxytocin and ACTH secretion during pregnancy and parturition. In. J. A. RUSSELL, A. J. DOUGLAS, R. J. WINDLE & C. D. INGRAM (Eds). *The Maternal Brain. Neurobiological and Neuroendocrine Adaptation and Disorders in Pregnancy and*

Post Partum. **Progress in Brain Research**, vol. 133 (2001). Elsevier, Amsterdam, pp. 67-82.

DOUGLAS, A. J, JOHNSTONE, H. A., WIGGER, A., LANDGRAF, R., RUSSEL, J. A. & NEUMANN, I. D. The role of endogenous opioids in neurohypophysial and hypothalamo-pituitary-adrenal axis hormone secretory responses to stress in pregnant rats. **Journal of Endocrinology** 158 (1998): 285-293.

EUKER, J. S. & RIEGLE, G. D. Effects of stress on pregnancy in the rat. **Journal of Reproduction and Fertility** 34 (1973): 343-346.

FAMELI, M.; KITRAKI, E. & STYLIANOUPOULOU, F. Maternal behavior of dams treated with ACTH during pregnancy. **Physiology & Behavior** 57 (1995): 397–400.

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

FERREIRA, A.; HANSEN, S.; NIELSEN, M.; ARCHER, T. & MINOR, B.G. Behavior of mother rats in conflict tests sensitive to antianxiety agents. **Behavioral Neuroscience** 103 (1989): 193–201.

.

FERREIRA, A.; PEREIRA, M.; AGRATI, D.; URIARTE, N. & FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. **Physiology & Behavior** 77 (2002): 197–204.

FLEMING, A. S. & LUEBKE, C. Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females.

Physiology & Behavior 27 (1981): 863–868

FLEMING, A. S.; O'DAY, D. H. & KRAEMER, G. W. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 23 (1999): 673-685.

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

FRANCIS, D. D.; YOUNG, L. J.; MEANEY, M. J. & INSEL, T. R. Naturally occurring differences in maternal care are associated with the expression of oxytocin and vasopressin (V1a) receptors: gender differences. **Journal of Neuroendocrinology** 14 (2002): 349-353.

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

GIOVENARDI, M.; DE AZEVEDO, M. S.; DA SILVA, S. P.; HERMEL, E. E.; GOMES, C. M. & LUCION, A. B. Neonatal handling increases fear and aggression in lactating rats. **Physiology and Behavior**, 86 (2005): 209-217.

GOMES, C. M.; FRANTZ, P. J.; SANVITTO, G. L.; ANSELMO-FRANCI, J. A. & LUCION, A. B. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research 32 (1999): 1239-1242.

GÖTZ, A. A.; WOLF, M. & STEFANSKI, V. Psychosocial maternal stress during pregnancy: Effects on reproduction for F0 and F1 generation laboratory rats.

Physiology & Behavior 93 (2008): 1055-1060.

GRIMM, V. E. & FRIEDER, B. The effects of mild maternal stress during pregnancy on the behavior of rat pups. **The International Journal of Neuroscience** 35 (1987): 65-72.

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

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

GUTTELING, B. M.; DE WEERTH, C.; WILLEMSSEN-SWINKELS, S. H.; HUIZINK, A. C.; MULDER, E. J.; VISSER, G. H. & BUITELAAR, J. K. The effects of prenatal stress on temperament and problem behavior of 27-month-old toddlers. **European Child & Adolescent Psychiatry** 14 (2005): 41-51.

HANDA, R.J.; BURGESS, L.H.; KERR, J.E. & O'KEEFE, J.A. Gonadal steroid hormone receptor and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis.

Hormones and Behavior 28 (1994): 464-476.

HÅRD, E. & HANSEN, S. Reduced fearfulness in the lactating rat. **Physiology &**

Behavior 33 (1985): 641–643.

HEIM, C.; OWENS, M. J.; PLOTSKY, P. M. & NEMEROFF, C. B. Persistent changes in corticotropin-releasing factor system due to early life stress: Relationship to the pathophysiology of major depression and post-traumatic stress disorder.

Psychopharmacology Bulletin 33 (1997): 185-192.

HENRY, C.; KABBAJ, M.; SIMON, H.; LE MOAL, M. & MACCARI, S. Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats.

Journal of Neuroendocrinology 6 (1994): 341-345.

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

84.

HERRENKOHL, L. R. Prenatal stress reduces fertility and fecundity in female offspring. **Science** 206 (1979): 1097-1099.

HIGUCHI, T., HONDA, K., TAKANO, S. & NEGORO, H. Reduced oxytocin response to osmotic stimulus and immobilization stress in lactating rats. **The Journal of Endocrinology** 116 (1988): 225-230.

HIGUCHI, T., NEGORO, H. & ARITA, J. Reduced responses of prolactin and catecholamine to stress in the lactating rat. **The Journal of Endocrinology** 122(1989): 495-498.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 54 (1996): 21-30.

HOMER C. J., JAMES, S. A. & SIEGEL, E. Work-related psychosocial stress and risk of preterm, low birthweight delivery. **American Journal of Public Health** 80 (1990): 173-177.

HUTTUNEN, M. O. & NISKANEN, P. Prenatal loss of father and psychiatric disorders. **Archives of General Psychiatry** 35 (1978): 429-431.

INSEL, T. R & YOUNG, L. J. The neurobiology of attachment. **Nature Reviews Neuroscience** 2 (2001): 129-136.

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

JOHNSTONE, H. A., SECKL, J. R. & RUSSELL, J. A. Corticosteroid feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the late pregnant rat. **The Journal of Endocrinology** 156 (Suppl.) (1998): P182.

JOHNSTONE, H. A., WIGGER, A., DOUGLAS, A. J., NEUMANN, I. D., LANDGRAF, R., SECKL, J. R. & RUSSELL, J. A. Attenuation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: changes in feed-forward and feedback mechanisms. **Journal of Neuroendocrinology** 12 (2000): 811-822.

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

KELLER-WOOD, M. Reflex regulation of hormonal responses during pregnancy. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology** 22 (1995): 143-151

KIAER, S. L.; WEGENER, G.; ROSERNBERG, R.; LUND, S. P. & HOUGAARD, K. S. Prenatal and adult stress interplay—behavioral implications. **Brain Research** 1320 (2010): 106-113.

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

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

LADD, C. O.; HUOT, R. L.; THRIVIKRAMAN, K. V.; NEMEROFF, C. B.; MEANEY, M. J. & PLOTSKY, P. M. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to the adverse early experience. In: MAYER, E. A. & SAPER, C. B. editors. **Progress in brain research: the biological basis for mind body interactions**. Amsterdam: Elsevier, 2000. pp. 81-103.

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

LIGHTMAN, S. L. & YOUNG III, W. S. Lactation inhibits stress-mediated secretion of corticosterone and oxytocin and hypothalamic accumulation of corticotrophin-releasing factor and endorphin messenger ribonucleic acids. **Endocrinology** 124 (1989): 2358-2364.

LIGHTMAN, S.L., WINDLE, R. J., WOOD, S. A., KERSHAW, Y. M., SHANK, N. & INGRAM, C. D. Peripartum plasticity within the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. In: J. A. Russell, A. J., Douglas, R. J. Windle & C. D. Ingram (Eds). *The Maternal Brain. Neurobiological and Neuroendocrine Adaptation and Disorders in Pregnancy and Post Partum*. **Progress in Brain Research**, vol. 133 (2001). Elsevier, Amsterdam, pp. 111-142.

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

LONSTEIN, J. S.; SIMMONS, D. A. & STERN, J. M. 1998. Functions of the caudal periaqueductal gray in lactating rats: kyphosis, lordosis, maternal aggression and fearfulness. **Behavioral Neuroscience** 112 (1998): 1502–1518.

LONSTEIN, J.S.; WAGNER, C.K. & De Vries, G.J. Comparison of the “nursing” and other parental behaviors of nulliparous and lactating female rats. **Hormones and Behavior** 36 (1999): 242–251.

LORDI, B., PATIN, V., PROTAIS, P., MELLIER, D. & CASTON, J. Chronic stress in pregnancy rats: effects on growth rate, anxiety and memory capabilities of the offspring. **International Journal of Psychophysiology** 37 (2000): 195-205.

LOVISI, G. M.; LOPEZ, J. R. A.; COUTINHO, E. S. F. & PATEL, V. Poverty, violence and depression during pregnancy: a survey of mothers attending a public hospital in Brazil. **Psychological Medicine** 35 (2005): 1485-1492.

MACCARI, S.; PIAZZA, P. V.; KABBAJ, M.; BARBAZANGES, A.; SIMON, H. & LE MOAL, M. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. **The Journal of Neuroscience** 15 (1995): 110-116.

MAUCHER, J. M. & RAMSDELL, J. S. Maternal-Fetal transfer of Domoic Acid in rats at two gestational time points. **Environmental Health Perspectives** 115 (2007): 1743-1746.

MCCARTY, R., CIERPIAL, M. A., MURPHY, C. A. & LEE, J. H. Maternal involvement in the development of cardiovascular phenotypes. **Experientia** 48 (1992): 315-322.

MEANEY, M.J.; SEEMA, B.; LAROCQUE, S.; MCCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V. & PLOTSKY, P.M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. **Annals of New York Academy of Sciences** 697 (1993): 70-85.

MEERLO, P.; HORVATH, K. M.; NAGY, G. J.; BOHUS, B. & KOOLHAAS, J. M. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stressreactivity. **Journal of Neuroendocrinology** 11 (1999): 925-933.

MELIA, K.R. & DUMAN, R.S. Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 88 (1991): 8382-8386.

MELNICZEK, J. R. & WARD, I. L. Patterns of ano-genital licking mother rats exhibit toward prenatally stressed neonates. **Physiology & Behavior** 56 (1994): 457-461.

MORICEAU, S. & SULLIVAN, R. M. Neurobiology of infant attachment. **Developmental Psychobiology** 47 (2005): 230-242.

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

MOORE, C.L. & POWER, K.L. Prenatal stress affects mother–infant interaction in Norway rats. **Developmental Psychobiology** 19 (1986): 235–245.

NEUMANN, I.; LUDWIG, M.; ENGELMANN, M.; PITTMAN, Q. J & LANDGRAF, R. Simultaneous microdialysis in blood and brain: oxytocin and vasopressin release in response to central and peripheral osmotic stimulation and suckling in the rat. **Neuroendocrinology**, 58 (1993): 637-645.

NEUMANN, I.; LANDGRAF, R.; BAUCE, L. & PITTMAN, Q. J. Osmotic responsiveness and crosstalk involving oxytocin, but no vasopressin or amino acids, between the supraoptic nuclei in virgin and lactating rats. **The Journal of Neuroscience** 15 (1995): 3408-3417.

NEUMANN, I. D.; JOHNSTONSE, H. A.; HATZINGER, M.; LIEBSCH, G.; SHIPSTON, M.; RUSSELL, J. A.; LANDGRAF, R. & DOUGLAS, A. J. Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohipophysial changes. **The Journal of Physiology** 508 (1998): 289-300.

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

NUMAN, M. Maternal behavior. In: The physiology of reproduction. Ed. Knobil, E. & Neill, J. (ed.) **Raven Press Ltd.**, New York; 1988.

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

NUMAN, M. & INSEL, T. R. **The neurobiology of parental behavior**. New York: Springer; 2003.

OVERMEIR, J. B.; SELIGMAN, M. E. P. Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance learning. **Journal of Comparative and Physiological Psychology** 63 (1967): 28-33.

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

PARDON, M.; GERARDIN, P.; JOUBERT, C.; PEREZ-DIAZ, F. & COHEN-SALMON, C. Influence of prepartum chronic ultramild stress on maternal pup care behavior in mice. **Biological Psychiatry** 47 (2000): 858-863.

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

PATIN, V.; LORDI, B.; VINCENT, A. & CASTON, J. Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. **Developmental Brain Research** 160 (2005), 265–274.

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

PAWLUSKI, J. L.; LIEBLICH, S. E. & GALEA, L. A. Offspring-exposure reduces depressive-like behavior in the parturient female rat. **Behavioural Brain Research** 197 (2009): 55-61.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; VRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods** 14 (1985): 149-167.

PEREIRA, M.; URIARTE, N.; AGRATI, D.; ZULUAGA, M. J. & FERREIRA, Motivational aspects of maternal anxiolysis in lactating rats. **Psychopharmacology** 180 (2005): 241–248.

PETERS, D. A. Both prenatal and postnatal factors contribute to the effects of maternal stress on offspring behavior and central 5-hydroxytryptamine receptors in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 30 (1988): 669-673.

POINDRON, P. Mechanisms of activation of maternal behavior in mammals. **Reproduction, Nutrition, Development** 45 (2005): 341-351.

LÉVY, F.; KELLER, M. & POINDRON, P. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. **Hormones and Behavior** 46 (2004): 284-302.

LÉVY, F. Physiological and sensorial determinism of maternal behavior in mammals. **Contraception, Fertilité, Sexualité** 26 (1998): 718-727.

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

POLLARD, I. Effects of stress administered during pregnancy on reproductive capacity and subsequent development of the offspring of rats: prolonged effects on the litters of a second pregnancy. **The Journal of Endocrinology** 100 (1984): 301-306.

POLTYREV, T.; KESHET, G. I.; KAY, G. & WEINSTOCK, M. Role of experimental condition in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats. **Developmental Psychobiology** 29 (1996): 453-462.

POLTYREV, T. & WEINSTOCK, M. Gender differences in the prevention of hyperanxiety in adult prenatally stressed rats by chronic treatment with amitriptyline.

Psychopharmacology 181 (2005): 118–125.

POPOVA, J. S. & PETKOV, V. V. Changes in 5-HT₁ receptors in different brain structures rats with isolation syndrome. **General Pharmacology** 21 (1990): 223-225.

POWER, K. L. & MOORE, C. L. Prenatal stress eliminates differential maternal attention to male offspring in Norway rats. **Physiology & Behavior** 38 (1986): 667-671.

RIMA, B. N; BARDI, M.; FRIEDENBER, J. M.; CHRISTON, L. M., KARELINA, K. E.; LAMBERT, K. G. & KISNLEY, C. H. Reproductive experience and the response of female Sprague-Dawley rats to fear and stress. **Comparative Medicine** 59 (2009): 437-443.

RODGERS, R. J. Animal models of anxiety: where next? **Behavioural Pharmacology** 8 (1997): 477-496.

RUNNER, M. L. Embryocidal effect of handling pregnant mice and its prevention with progesterone. **The Anatomical Record** 133 (1959): 330-331.

SALGADO, A. S.; MARTINEZ, S. M. & TARRES, M. C. Body weight of litters of rats stressed during pregnancy. **Medicina** 37 (1977): 38-42.

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

SCHELSTRAETE, I., KNAEPEN, E., DUTILLEUL, P. & WEYERS, M.H. Maternal Behavior in the wistar rat under atypical zeitgeber. **Physiology & Behavior** 52 (1992): 189-193.

SMITH, B. L., WILLS, G. & NAYLOR, D. The effects of prenatal stress on rat offsprings' learning ability. **Journal of Psychology** 107 (1981): 41-51.

SMITH, J. W., SECKL, J. R., EVANS, A. T., CONSTALL, B. & SMYTHE, J. W. Gestational stress induces post-partum depression-like behaviour and alters maternal care in rats. **Psychoneuroendocrinology** 29 (2004): 227-244.

STOTT, D. H. Follow-up study from birth of the effects of prenatal stresses. **Developmental Medicine and Child Neurology** 15 (1973): 770-787.

STERN, J. M., GOLDMAN, L. & LEVINSE, S. Pituitary-adrenal responsiveness during lactation in rats. **Neuroendocrinology** 12 (1973): 179-191.

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

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

TOUFEXIS, D. J. & WALKER, C. D. Noradrenergic facilitation of the adrenocorticotropin response to stress is absent during lactation in the rat. **Brain Research** 737 (1996): 71-77.

TREIT, D.; MENARD, J. & ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 44 (1993): 463-469.

VAN OS, J. & SELTEN, J. P. Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia: the May 1940 invasion of the Netherlands. **The British Journal of Psychiatry** 172 (1998): 324-326.

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

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

WALKER, C. -D., LIGHTMAN, S. L., STEELE, M. & DALLMAN, M. F. Suckling is a persistent stimulus to the adrenocortical system of the rat. **Endocrinology** 130 (1992): 115-125.

WALKER, C.-D.; TROTTIER, G., ROCHFORD, J. & LAVALÉE, D. Dissociation between behavioral and hormonal responses to the forced swim stress in lactating rats. **J. Neuroendocrinol.** 7 (1995): 615-622.

WATSON, J. B.; MEDNICK, S. A.; HUTTUNEN, M. & WANG, X. Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. **Development and Psychopathology** 11 (1999): 457-466.

WEAVER, I. C. G.; CERVONI, N.; CHAMPAGNE, F. A.; D'ALESSIO, A. C.; SHARMA, S.; SECKL, J. R.; DYMOV, S.; SZYF, M. & MEANEY, M. J. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature Neuroscience** 7 (2004): 847-854.

WEINSTOCK, M.; FRIDE, E. & HERTZBERG, R. Prenatal stress effects on functional development of the offspring. **Progress in Brain Research** 73 (1988): 319-331.

WEINSTOCK, M.; MATLINA, E.; MAOR, G. I.; ROSEN, H. & McEWEN, B. S. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat. **Brain Research**, 595 (1992): 195-200.

WEINSTOCK, M. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic pituitary adrenal axis? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 21 (1997): 1-10.

WELLER, A.; GLAUBMAN, H.; YEHUDA, S.; CASPY, T. & BEN-URIA, Y. Acute and repeated gestational stress affect offspring learning and activity in rats. **Physiology & Behavior** 43 (1988): 139-143.

WILDT, D. E.; RIEGLE, G. D. & DUKELOW, W. R. Physiological temperature response and embryonic mortality in stressed swine. **The American Journal of Physiology** 229 (1975): 1471-1475.

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

WINDLE, R. J., BRADY, M. M., KUNANANDAM, T., DA COSTA, A. P. C., WILSON, B. C., HARBUZ, M., LIGHTMAN, S. L. & INGRAM, C. D. Reduced response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to α 1-agonist stimulation during lactation. **Endocrinology**, 138 (1997): 3714-3748.

WINDLE, R. J., WOOD, S., SHANKS, N., PERKS, P., CONDE, G. L., DA COSTA, A. P. C., INGRAM, C. D & LIGHTMAN, S. L. Endocrine and behavioral responses to noise stress: comparison of virgin and lactating female rats during non-disrupted maternal activity. **Journal of Neuroendocrinology** 9 (1997b): 407-414.

Anexos

ANEXO I

Gráficos relacionados à análise dia-a-dia, ciclo-a-ciclo do comportamento maternal de ratas submetidas a eventos estressores durante o período perinatal.

Para todos os dados relacionados ao comportamento maternal, o número de animais por grupo são:

- Grupo Controle: 12 animais;
- Grupo Estresse Pré-Natal: 12 animais;
- Grupo Estresse Pós-Natal: 11 animais;
- Grupo Estresse Pré + Pós-Natal: 12 animais.

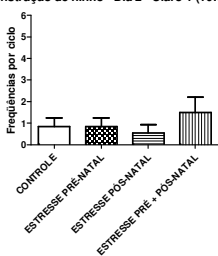
Os comportamentos analisados foram: construção de ninho, amamentação, interação com os filhotes, mãe no ninho sem posição de amamentação, número de lambidas e permanência da mãe fora do ninho.

Os parâmetros analisado para cada um dos comportamentos foram as frequências de realizações dos mesmos. Os gráficos estão expressos em médias \pm erros médios padrões. O nível de significância aceito foi de $p < 0.05$.

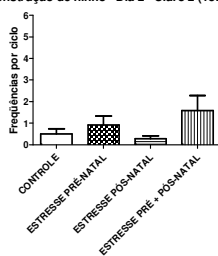
Construção de ninho:

A

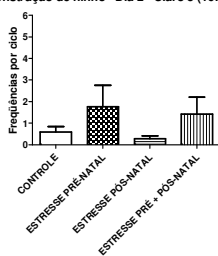
Construção de ninho - Dia 2 - Claro 1 (10:00h)



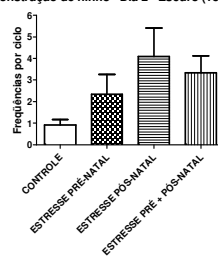
Construção de ninho - Dia 2 - Claro 2 (13:00h)



Construção de ninho - Dia 2 - Claro 3 (16:00h)

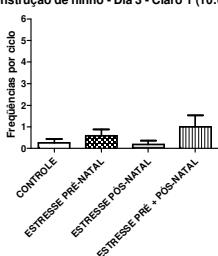


Construção de ninho - Dia 2 - Escuro (18:30h)

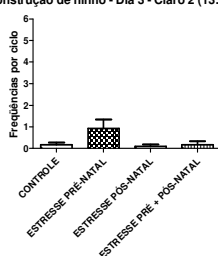


B

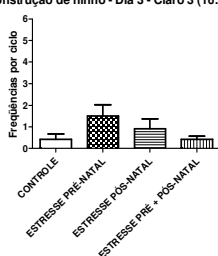
Construção de ninho - Dia 3 - Claro 1 (10:00h)



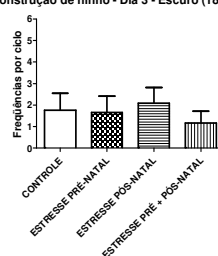
Construção de ninho - Dia 3 - Claro 2 (13:00h)



Construção de ninho - Dia 3 - Claro 3 (16:00h)

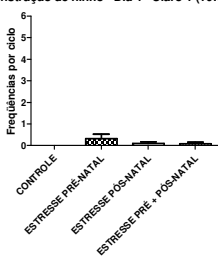


Construção de ninho - Dia 3 - Escuro (18:30h)

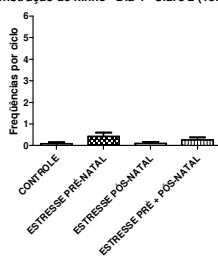


C

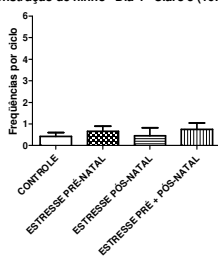
Construção de ninho - Dia 4 - Claro 1 (10:00h)



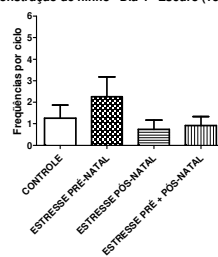
Construção de ninho - Dia 4 - Claro 2 (13:00h)



Construção de ninho - Dia 4 - Claro 3 (16:00h)

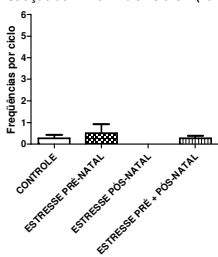


Construção de ninho - Dia 4 - Escuro (18:30h)

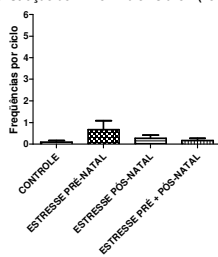


D

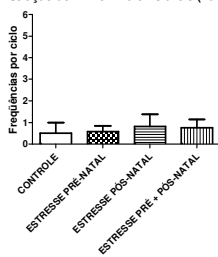
Construção de ninho - Dia 5 - Claro 1 (10:00h)



Construção de ninho - Dia 5 - Claro 2 (13:00h)



Construção de ninho - Dia 5 - Claro 3 (16:00h)



Construção de ninho - Dia 5 - Escuro (18:30h)

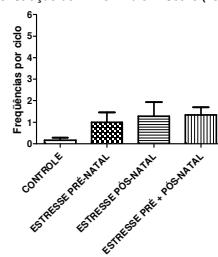


Figura 31. Construção do ninho. **A.** Frequências de construção do ninho. Dia 2 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **B.** Frequências de construção do ninho. Dia 3 pós-natal: período claro 1,

claro 2, claro 3 e escuro. **C.** Frequências de construção do ninho. Dia 4 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.. **D.** Frequências de construção do ninho. Dia 5 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

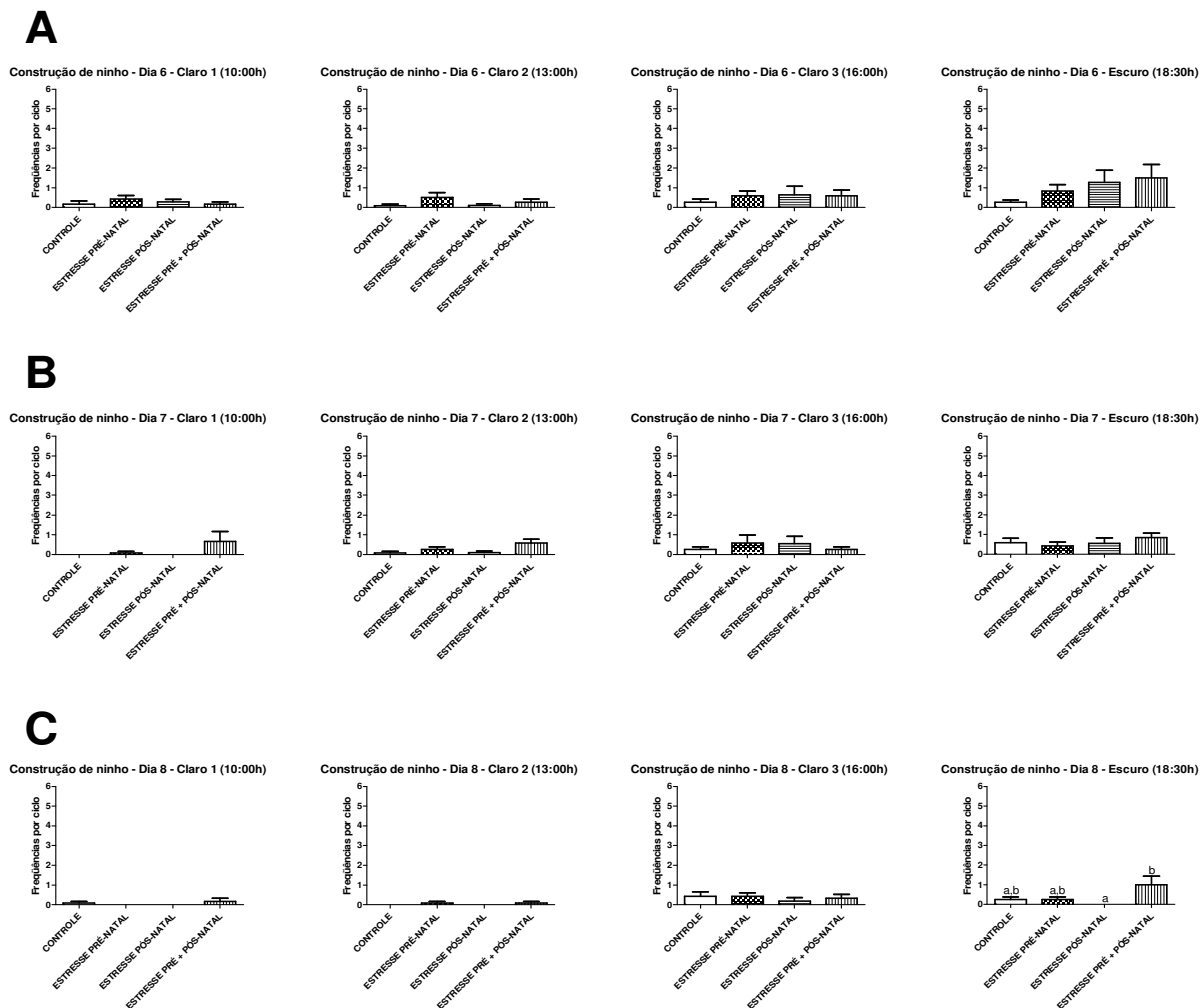
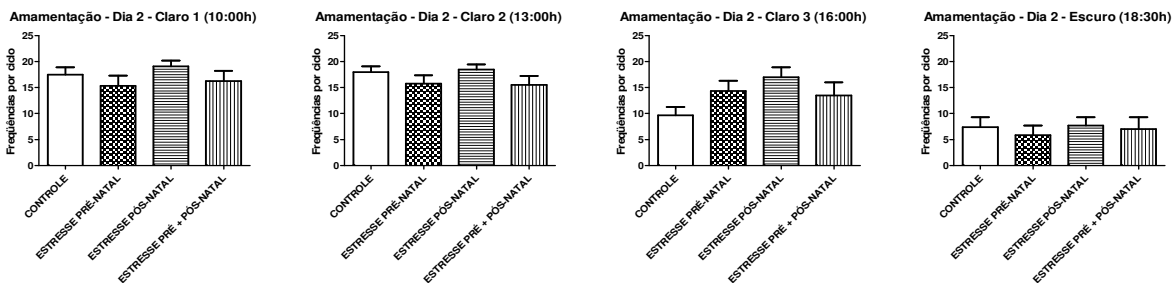


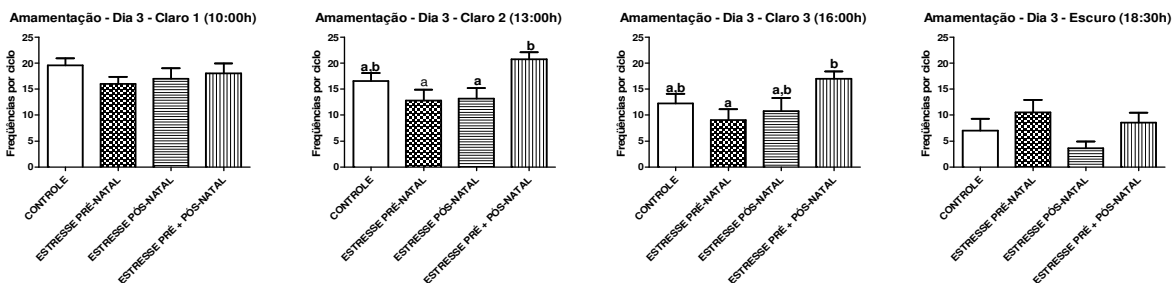
Figura 32. Construção do ninho. **A.** Frequências de construção do ninho. Dia 6 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **B.** Frequências de construção do ninho. Dia 7 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **C.** Frequências de construção do ninho. Dia 8 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

Amamentação:

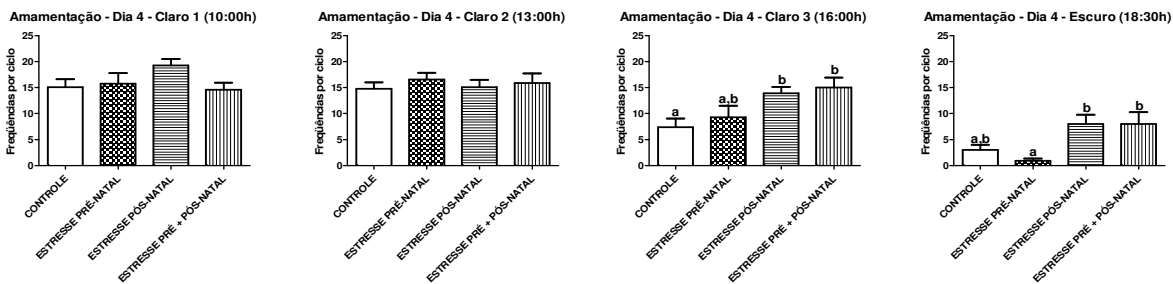
A



B



C



D

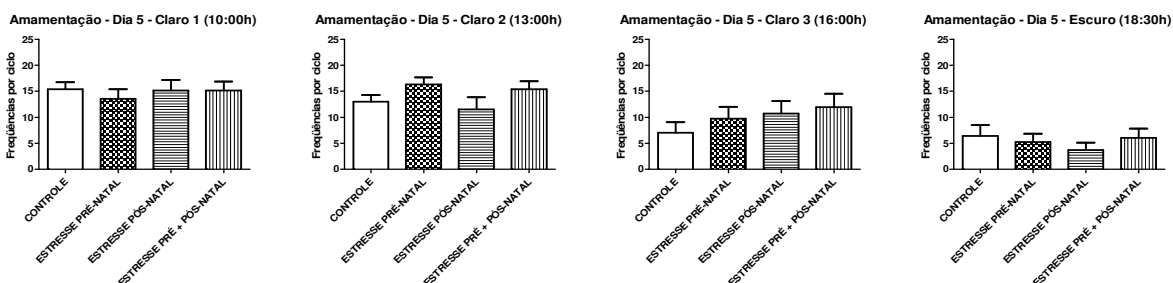


Figura 33. Amamentação. **A.** Freqüências de amamentação dia 2 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **B.** Freqüências de amamentação dia 3 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **C.** Freqüências de amamentação dia 4 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro..

D. Frequências de amamentação dia 5 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

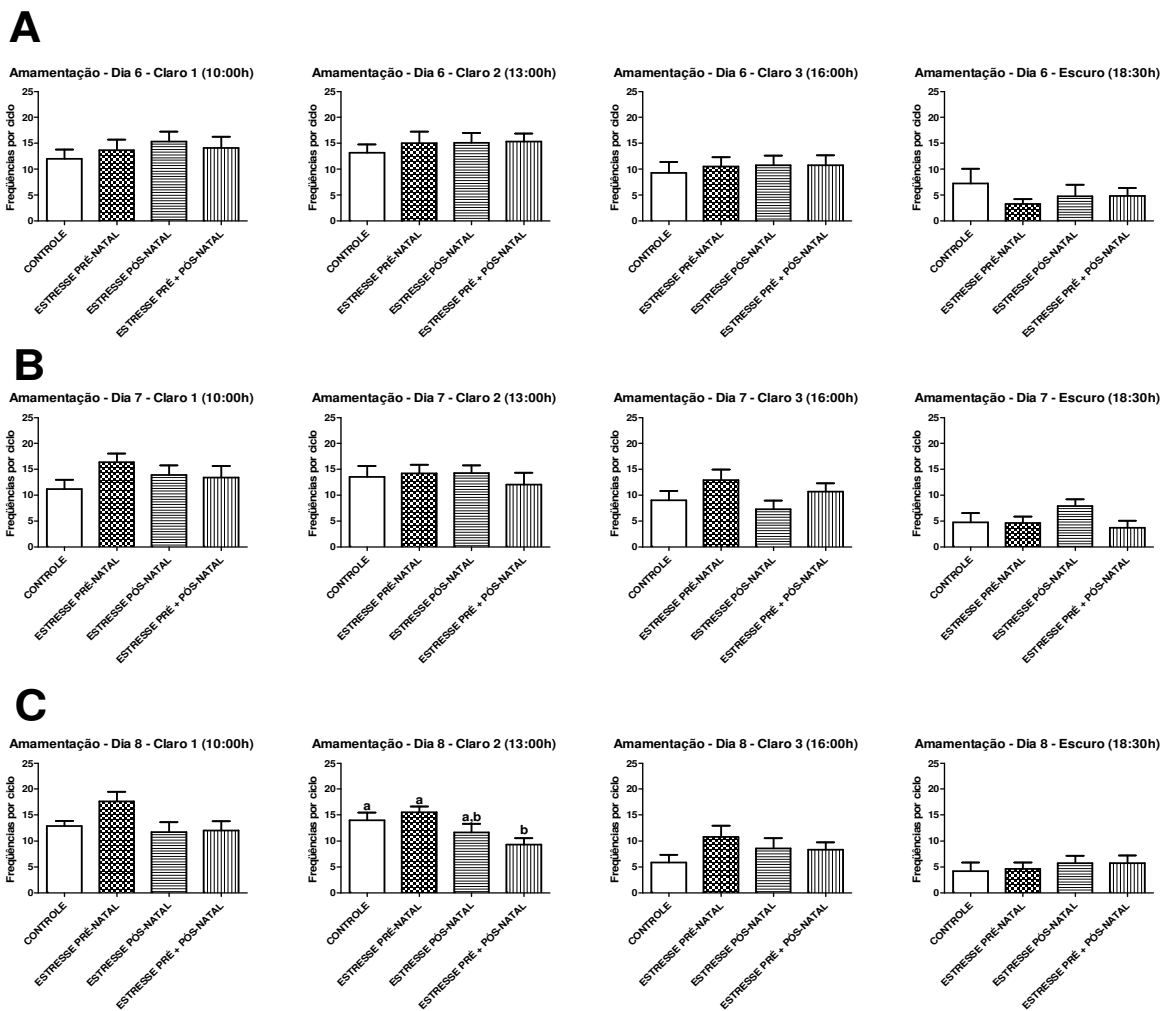
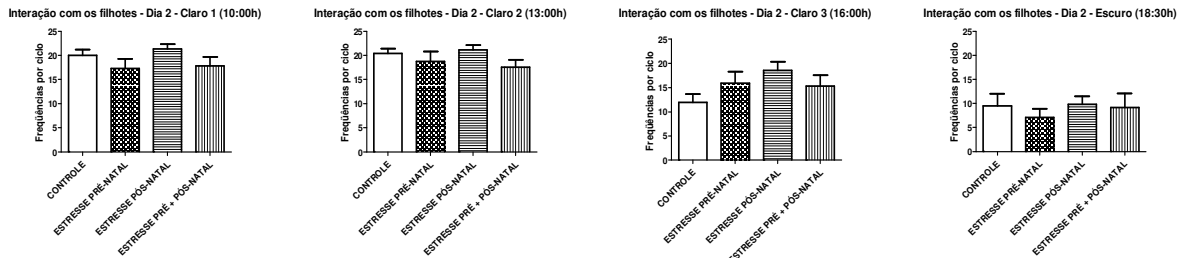


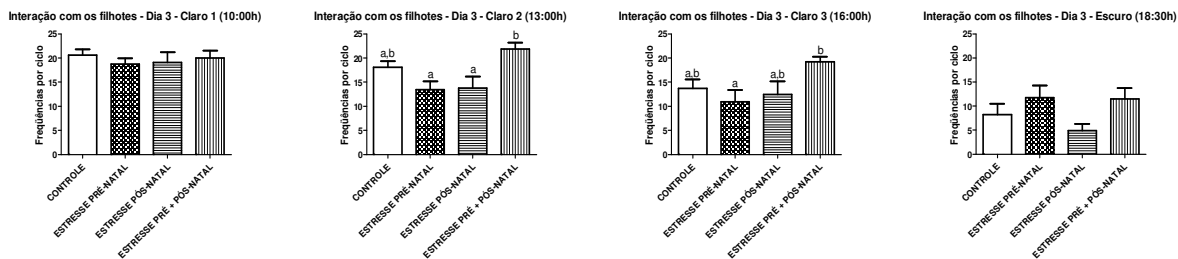
Figura 34. Amamentação. **A.** Frequências de amamentação dia 6 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **B.** Frequências de amamentação dia 7 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **C.** Frequências de amamentação dia 8 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

Interação com os filhotes:

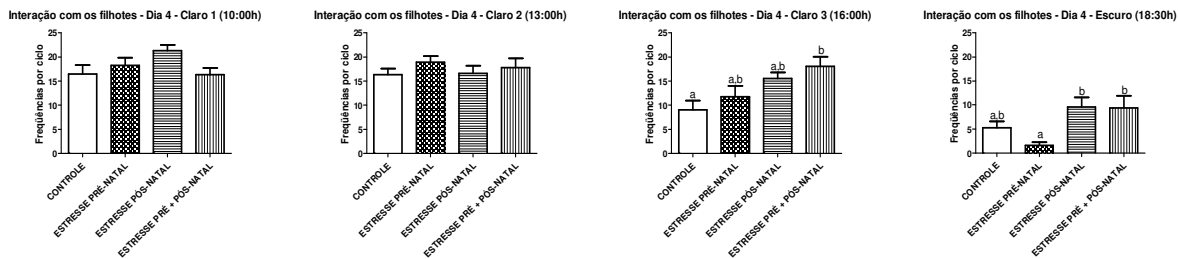
A



B



C



D

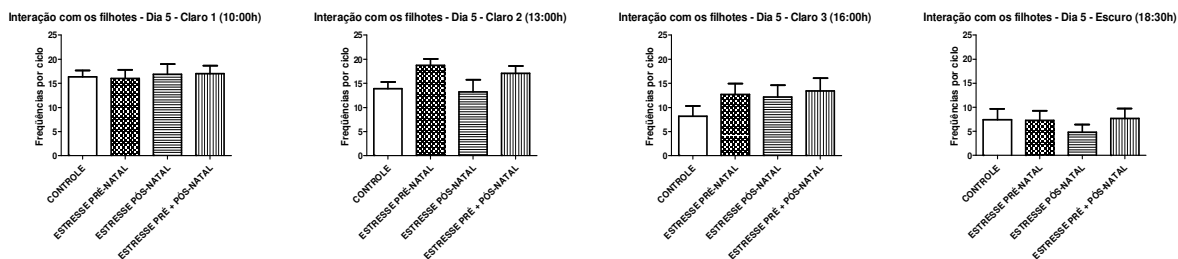
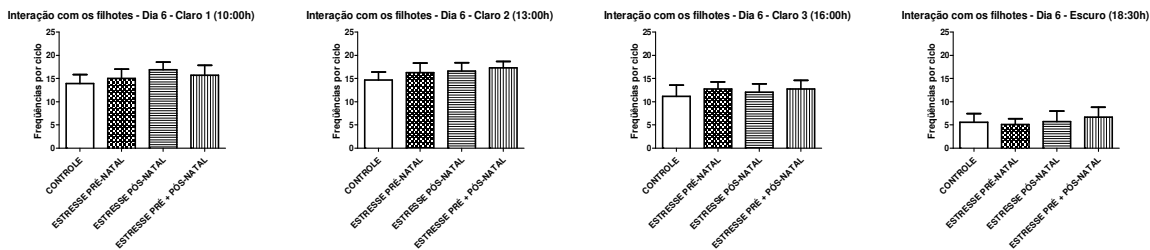


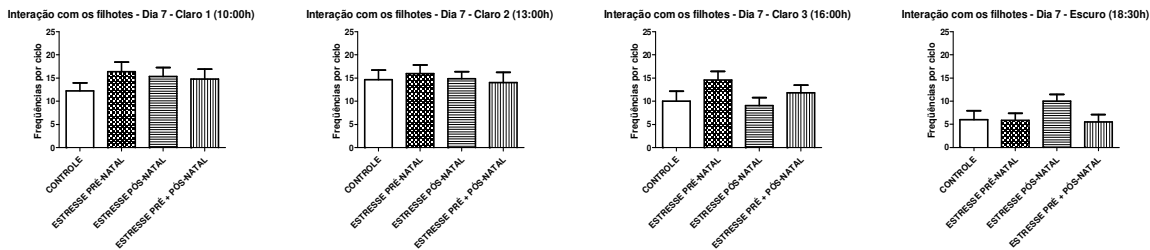
Figura 35. Interação com os filhotes. **A.** Freqüências de interação com os filhotes dia 2 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **B.** Freqüências de interação com os filhotes dia 3 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **C.** Freqüências de interação com os filhotes dia 4 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **D.** Freqüências de interação com os filhotes dia 5 pós-natal:

período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

A



B



C

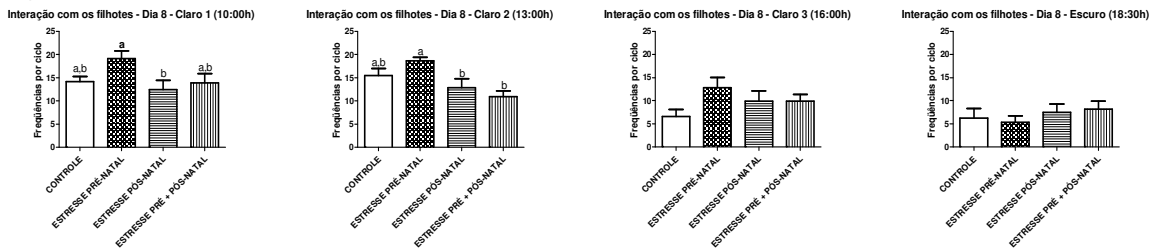
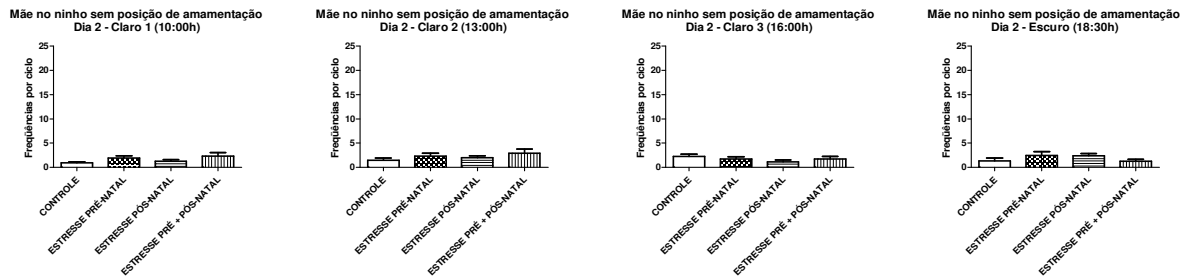


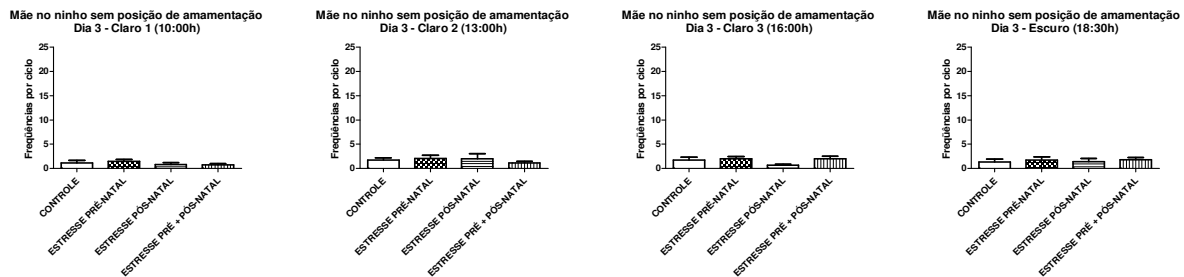
Figura 36. Interação com os filhotes. **A.** Freqüências de interação com os filhotes dia 6 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **B.** Freqüências de interação com os filhotes dia 7 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **C.** Freqüências de interação com os filhotes dia 8 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

Mãe no ninho sem posição de amamentação:

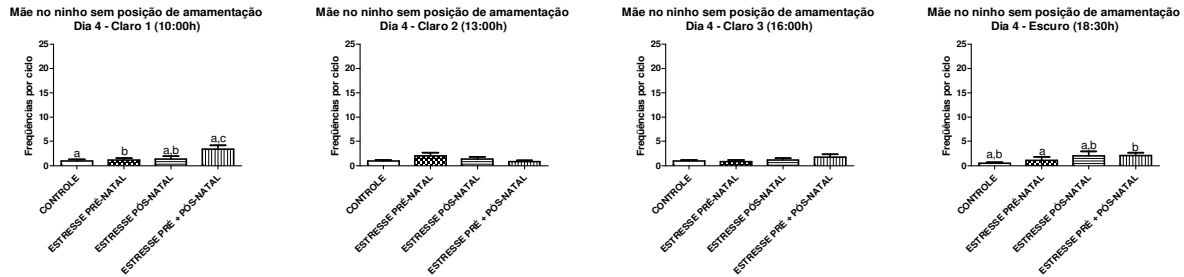
A



B



C



D

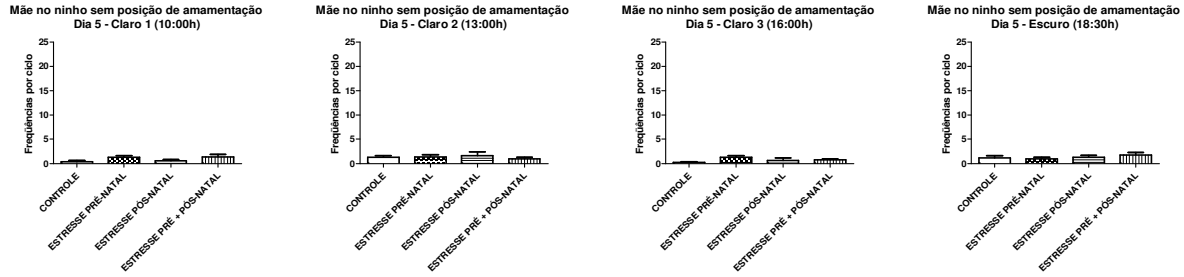


Figura 37. Mãe no ninho sem posição de amamentação. **A.** Frequências de mãe no ninho sem posição de amamentação dia 2 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **B.** Frequências de mãe no ninho sem posição de amamentação dia 3 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **C.** Frequências de mãe no ninho sem posição de amamentação dia 4 pós-natal: período claro

1, claro 2, claro 3 e escuro. **D.** Frequências de mãe no ninho sem posição de amamentação dia 5 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro.

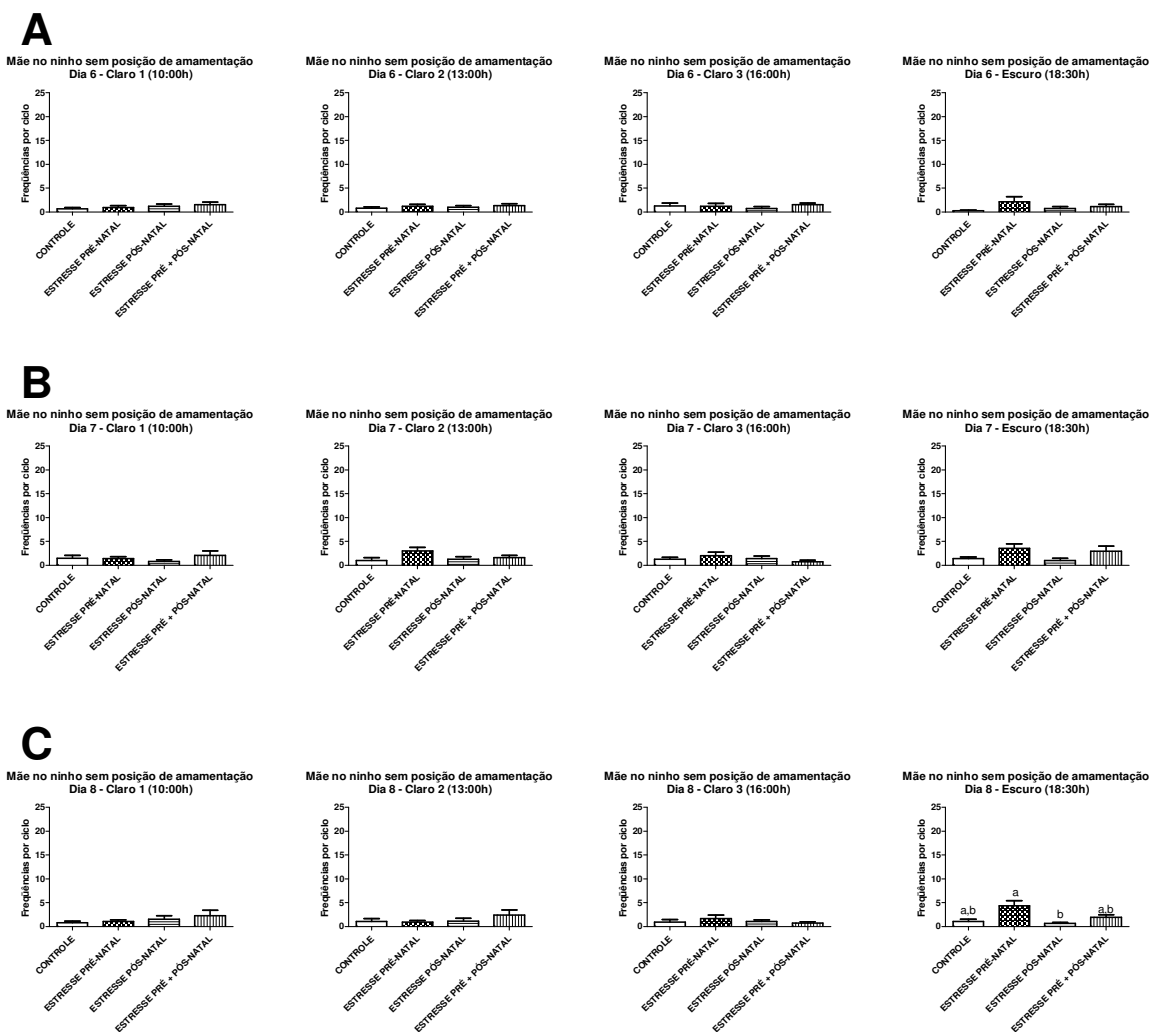


Figura 38. Mãe no ninho sem posição de amamentação. **A.** Frequências de mãe no ninho sem posição de amamentação dia 6 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **B.** Frequências de mãe no ninho sem posição de amamentação dia 7 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **C.** Frequências de mãe no ninho sem posição de amamentação dia 8 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

Número de lambidas:

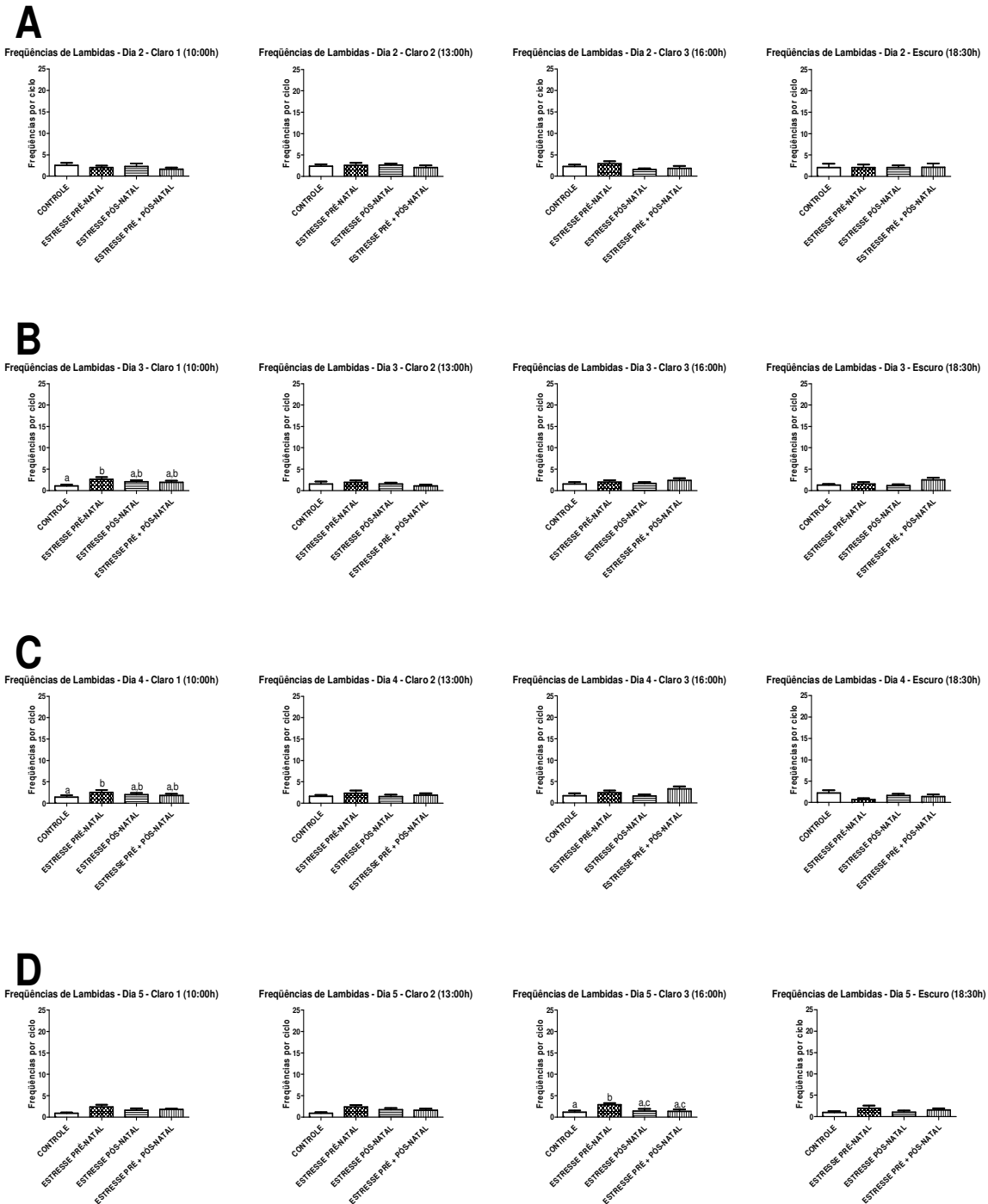


Figura 39. Número de lambidas. **A.** Frequências de número de lambidas dia 2 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **B.** Frequências de número de lambidas dia 3 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **C.** Frequências de número de lambidas dia 4 pós-natal: período

claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **D.** Frequências de número de lambidas dia 5 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

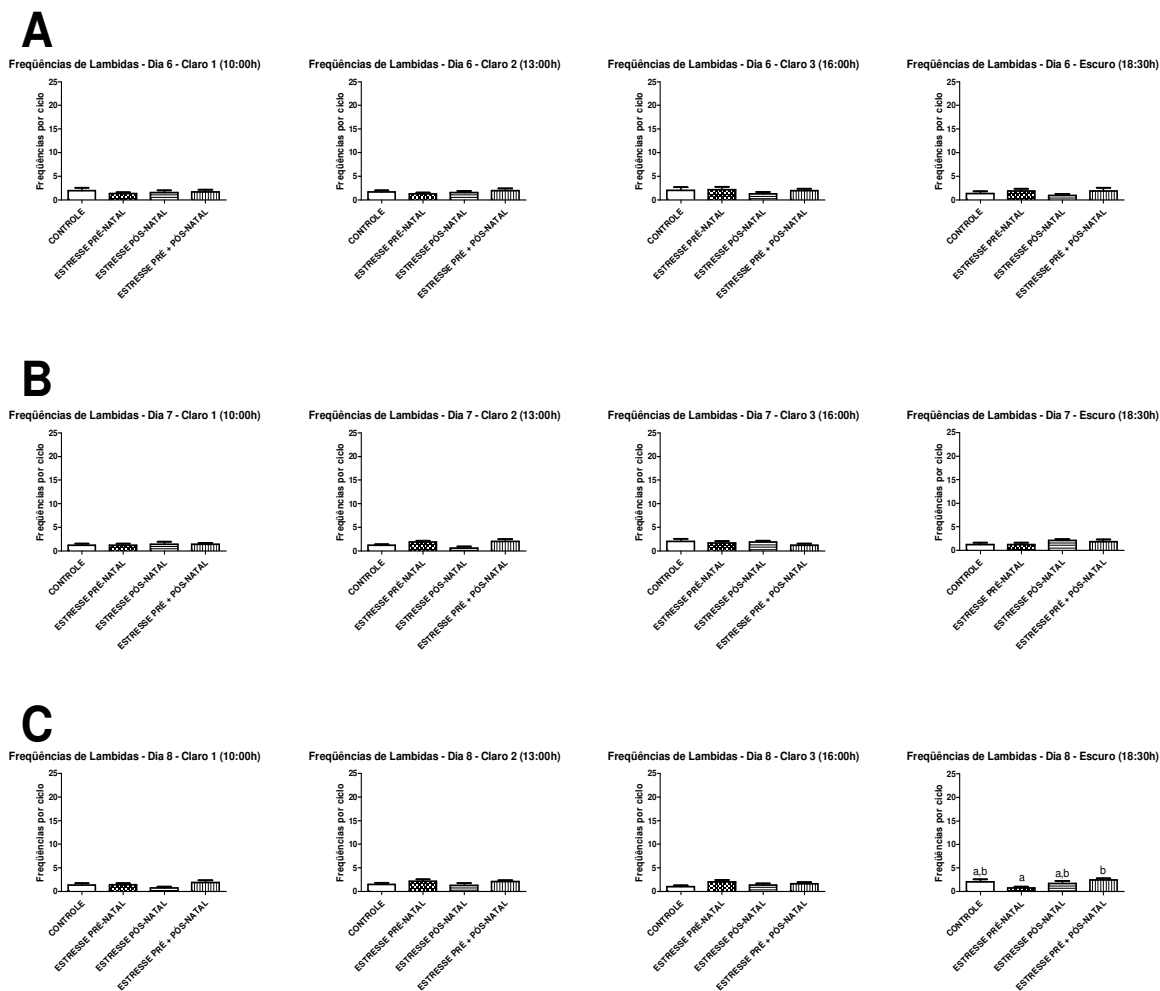


Figura 40. Número de lambidas. **A.** Frequências de número de lambidas dia 6 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **B.** Frequências de número de lambidas dia 7 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **C.** Frequências de número de lambidas dia 8 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

Permanência da mãe fora do ninho:

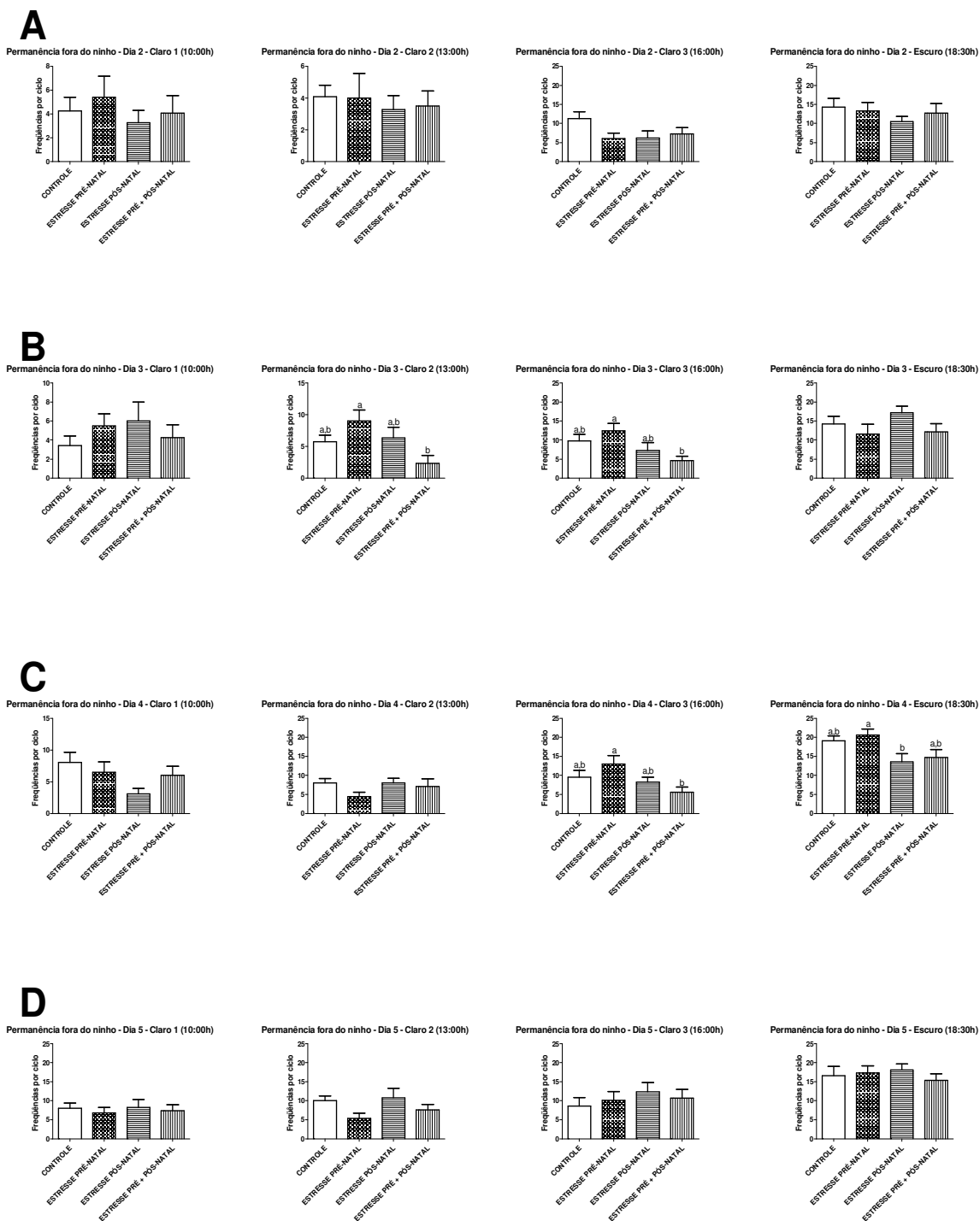


Figura 41. Permanência fora do ninho. **A.** Freqüências de permanência fora do ninho dia 2 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **B.** Freqüências de permanência fora do ninho dia 3 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **C.** Freqüências de permanência fora do ninho dia 4

pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. D. Frequências de permanência fora do ninho dia 5 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

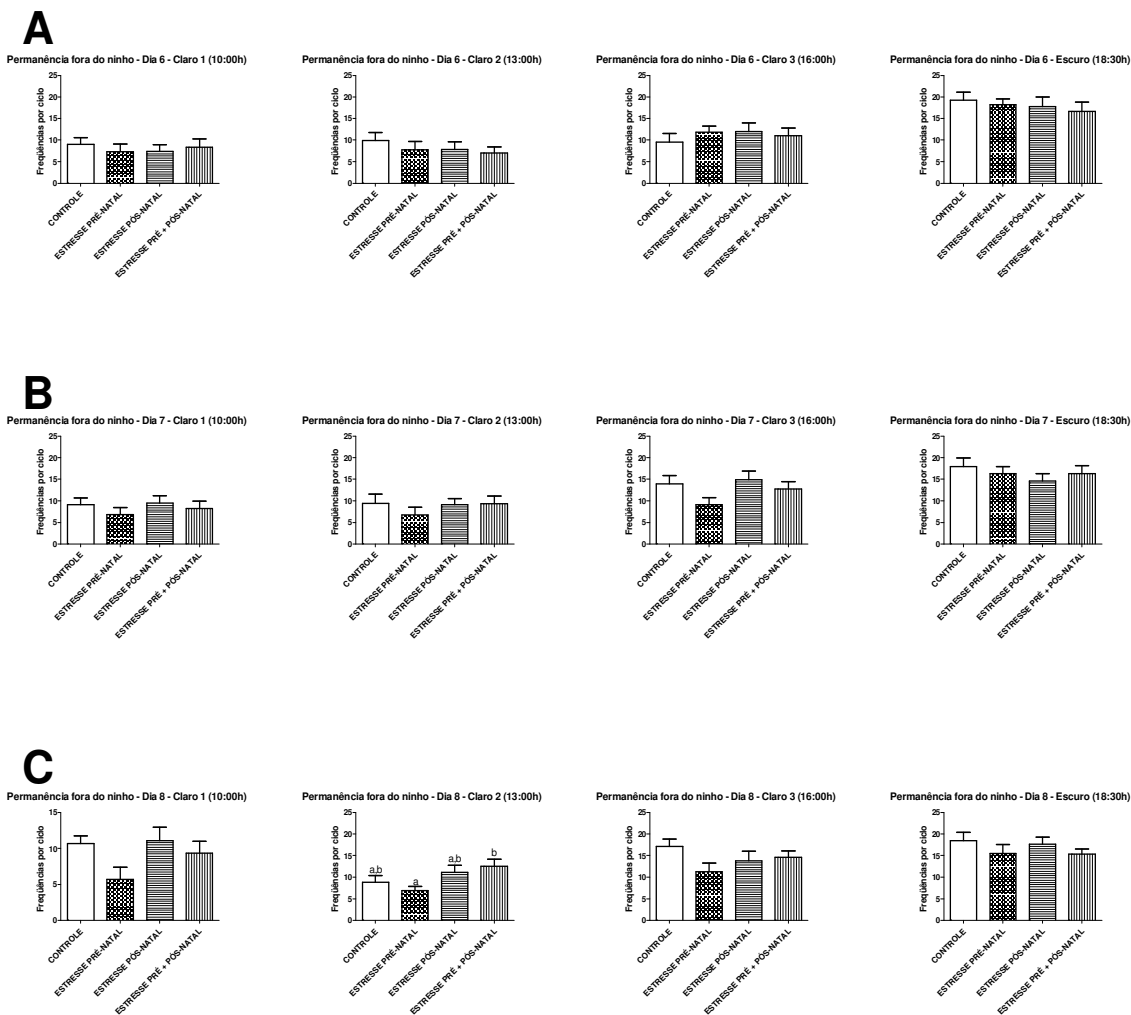


Figura 42. Permanência fora do ninho. **A.** Frequências de permanência fora do ninho dia 6 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **B.** Frequências de permanência fora do ninho dia 7 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. **C.** Frequências de permanência fora do ninho dia 8 pós-natal: período claro 1, claro 2, claro 3 e escuro. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).