

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DANIELA PEREIRA LAUREANO

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA MANIPULAÇÃO NEONATAL NO  
COMPORTAMENTO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

Porto Alegre

2010

DANIELA PEREIRA LAUREANO

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA MANIPULAÇÃO NEONATAL NO  
COMPORTAMENTO DE RATAS OVARIETOMIZADAS

Trabalho de conclusão de curso de graduação em Enfermagem da Escola de Enfermagem da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, realizado como requisito parcial para obtenção do título de Enfermeiro.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Carla Dalmaz  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Elizeth Heldt

Porto Alegre

2010

Dedico essa conquista a meus pais Olmiro e Araci, a meus irmãos Viviane e Márcio, que são a razão do meu viver.

A cada dia aprendo com eles o significado da vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me oportunizar essa nova reencarnação, essa nova oportunidade de aprendizado. Aos Espíritos amigos que iluminaram o meu caminho e me deram forças de chegar até aqui. Aos meus familiares tanto os que ainda estão aqui na Terra quanto os que já se foram pelo apoio que têm me dado. Principalmente a minha avó Luzia, que mesmo longe me amparou nos momentos mais difíceis do meu viver. E a minha avó Jovita, cuidar dela me ensinou a exercitar as virtudes da paciência e resignação.

A minha família. A minha mãe Araci que me deu colo e carinho em todas as horas, a sua docilidade me inspira, com você aprendi que o amor é a chave de tudo. Ao meu pai que sempre me apoiou em todas as minhas decisões, me ensinou os valores da honestidade, honradez, justiça, enfim me ensinou todos os valores que uma pessoa deve saber. Você sempre será um exemplo para mim. Ao meu irmão Márcio, apesar de nós sermos tão diferentes, quero que tu saibas que eu te amo de todo o coração. A minha irmã Viviane que ensinou a ser determinada, ela é amiga e companheira de todas as horas, sua paixão e dedicação me inspiram. Ao meu cunhado Paulo sempre tentando me ajudar.

Aos meus amigos e pessoas que me ajudaram ao longo de minha vida, muito obrigada por tudo. Cada pessoa foi importante/crucial em uma determinada fase da vida, aprendi um pouco com cada um.

As minhas orientadoras. Prof<sup>a</sup> Elizeth Heldt, muito obrigada por ter aceitado o desafio de me orientar, te admiro profundamente. Prof<sup>a</sup> Carla Dalmaz, obrigada por ter me dado a chance de ingressar no meio científico, agradeço a sua dedicação. Prof<sup>a</sup> Fernanda Fontella, agradeço por toda a atenção e carinho que tem por mim, obrigada por toda a sua doçura e afabilidade.

Agradeço a todo pessoal do laboratório 37, no departamento de Bioquímica, o convívio diário me tornou amiga e companheira de todos. Agradeço a Luísa por todo o seu apoio, é minha irmã e amiga de todas as horas, não tenho palavras para agradecer tudo o que já fez por mim. Ao Léo, ele me ensinou e me ensina muito, obrigada por toda a sua dedicação. A Rachel, sua alegria e entusiasmo me fascinam, obrigada pelos momentos de colo e de conselhos. A Cristie, que embora longe, sempre me ajudou e me ajuda, te admiro muito. A Letícia, que sempre está disposta a me ajudar. A prof<sup>a</sup> Deusa Vendite, obrigada por tudo. A Danusa, minha companheira de TCC, obrigada por sempre me ajudar nas horas cruciais/ mais difíceis. Aos meus colegas de laboratório André, Eduardo, Marina e Ana Paula, muito obrigada pelo companheirismo.

Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz.  
Onde houver ódio, que eu leve o amor,  
Onde houver ofensa , que eu leve o perdão,  
Onde houver discórdia, que eu leve a união,  
Onde houver dúvida, que eu leve a fé,  
Onde houver erro, que eu leve a verdade,  
Onde houver desespero, que eu leve a esperança,  
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria,  
Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Ó Mestre, fazei que eu procure mais  
consolar que ser consolado;  
compreender que ser compreendido,  
amar, que ser amado.  
Pois é dando que se recebe  
é perdoando que se é perdoado  
e é morrendo que se nasce para a vida eterna...

Assim seja

(atribuído a São Francisco de Assis)

## RESUMO

O período neonatal é um momento determinante no desenvolvimento do sistema nervoso central. A manipulação neonatal em ratos tem sido usada como um modelo de intervenção capaz de causar mudanças no sistema nervoso central, com efeitos comportamentais na idade adulta, embora muitas vezes esses efeitos não sejam observáveis antes da puberdade. Assim, é possível que a presença de hormônios gonadais seja importante para alguns efeitos da manipulação neonatal. O objetivo desse estudo foi verificar a associação entre a liberação de hormônios gonadais na puberdade e as alterações comportamentais observadas na idade adulta, em animais submetidos à manipulação neonatal, avaliando-se atividade motora e comportamento do tipo ansioso. As ninhadas provenientes de 22 ratas prenhes foram divididas em dois grupos: manipulado no período neonatal e não manipulado no período neonatal. Os animais manipulados no período neonatal foram separados de suas mães 10 minutos por dia, durante os primeiros 10 dias de vida e mantidos em uma incubadora a aproximadamente 34°C. Os animais foram desmamados aos 21 dias e divididos em três sub-grupos: ovariectomia (a cirurgia foi realizada entre 24 e 28 os dias de vida), *sham* (cirurgia, sem retirada dos ovários) e controle. Aos 60 dias, os animais foram submetidos às tarefas de Labirinto em Cruz Elevado (*Plus Maze*), Campo Aberto (*Open Field*) e o Teste do Conflito. Os resultados mostraram que no Labirinto em cruz elevado houve um efeito do estresse, mostrando que os animais não-manipulados produzem mais bolos fecais. No Campo Aberto, os animais manipulados apresentaram mais respostas de orientação e um maior número de cruzamentos. Ambos os grupos apresentaram memória da exposição ao Campo Aberto, tanto em relação às respostas de orientação quanto ao número de cruzamentos. Houve efeito do estresse sobre o comportamento de auto-limpeza, isto é, animais não manipulados apresentaram maior tempo de auto-limpeza do que os manipulados. No Teste do Conflito não encontramos diferenças significativas entre os grupos em qualquer dos parâmetros avaliados. Concluiu-se que os efeitos da manipulação no período neonatal em ratos não foram afetados pela ausência, desde o período pré-pubere, de hormônios ovarianos. Assim, a liberação desses hormônios durante o desenvolvimento não é necessária para a instalação dos efeitos da manipulação que se manifestam na idade adulta.

Palavras-chave: Manipulação neonatal, Privação materna, Ovariectomia, Comportamento.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Divisão e subdivisão da amostra

19

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA). Estímulos ambientais externos são captados pelo sistema límbico, ativando os sistemas de resposta ao estresse, entre eles o eixo HHA.	15
Figura 2	Incubadora onde foi realizada a manipulação neonatal.	20
Figura 3	Labirinto em Cruz Elevado ( <i>Plus Maze</i> ).	21
Figura 4	Campo Aberto ( <i>Open Field</i> ), na figura mostra um animal realizando <i>rearing</i> (resposta de orientação).	22
Figura 5	<i>Grooming</i> (auto limpeza)	23
Figura 6	Teste do conflito, rato sobre a plataforma.	24
Figura 7	Teste do conflito, animal realizando <i>rearing</i> .	24
Figura 8	Número de bolos fecais – Labirinto em Cruz Elevado	25
Figura 9	Tempo de permanência nos braços abertos – Labirinto em Cruz Elevado	26
Figura 10	Tempo de permanência nos braços fechado – Labirinto em Cruz Elevado	26
Figura 11	Número de entradas nos braços abertos – Labirinto em Cruz Elevado	27
Figura 12	Número de entradas nos braços fechados– Labirinto em Cruz Elevado	27
Figura 13	Número de respostas de orientação - Campo Aberto	29
Figura 14	Número de cruzamentos - Campo Aberto	30
Figura 15	Tempo de auto-limpeza ( <i>grooming</i> ) - Campo Aberto	31
Figura 16	Número de bolos fecais - Campo Aberto	31
Figura 17	Tempo nos quadrados centrais - Campo Aberto	32
Figura 18	Latência para o rato sair plataforma 1 – Teste do Conflito	33
Figura 19	Latência para o rato alcançar plataforma 2 – Teste do Conflito	33
Figura 20	Latência para o rato começar comer – Teste do Conflito	34
Figura 21	Tempo total que o rato permaneceu na água – Teste do Conflito	34
Figura 22	Número de respostas de orientação ( <i>rearings</i> ) – Teste do Conflito	35
Figura 23:	Número de investidas – Teste do Conflito	35
Figura 24	Frequência de auto-limpeza ( <i>grooming</i> ) – Teste do Conflito	36

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 REVISÃO DA LITERATURA/CONTEXTO TEÓRICO	14
3.1 Estresse Neonatal, Período Hiporresponsivo ao Estresse e a Relação Mãe-Filhote	14
3.2 Ciclo Estral	16
4 METODOLOGIA	18
4.1 Tipo de Estudo	18
4.2 Campo do Estudo	18
4.3 População e Amostra	18
4.4 Coleta dos Dados	19
4.4.1 Estresse neonatal	19
4.4.2 Ovariectomia	20
4.4.3 Labirinto em Cruz Elevado ( <i>Plus Maze</i> )	21
4.4.4 Campo Aberto ( <i>Open Field</i> )	22
4.4.5 Teste do Conflito	23
4.5 Análise dos Dados	24
4.6 Aspectos Éticos	24
5 RESULTADOS	25
5.1. Labirinto em Cruz Elevado ( <i>Plus Maze</i> ):	25
5.2. Campo Aberto ( <i>Open Field</i> ):	28
5.3. Teste do Conflito:	32
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO A – Carta de aprovação CEP - UFRGS	48
ANEXO B – Carta de aprovação COMPESQ - Escola de Enfermagem	49

## 1 INTRODUÇÃO

Durante o período neonatal ocorrem adaptações do recém-nascido à vida extra-uterina. Esse período é um momento determinante no desenvolvimento do sistema nervoso central do recém-nascido. Estudos demonstram que intervenções no período neonatal podem levar a alterações nos sistemas nervoso, cardiovascular, respiratório e endócrino–metabólico, além de alterações comportamentais. Experiências precoces alteram profundamente e permanentemente a trajetória do desenvolvimento, tendo influência a longo prazo nas funções cerebrais e no comportamento (HARLOW, 1958; LEVINE, 2005; BRANCHI; ALLEVA, 2006). Entre essas experiências, a privação prematura da figura materna pode influenciar o comportamento do indivíduo na vida adulta, podendo levar a transtornos psiquiátricos ou alterações comportamentais em parâmetros relacionados ao comportamento ansioso e alimentar. Em humanos, a prolongada falta de contato entre a mãe e seu filho logo após o nascimento resulta em um significativo déficit na relação mãe-bebê (KALINICHEV *et al.*, 2002).

A estimulação neonatal é um modelo experimental usado em ratos para avaliar os efeitos que as manipulações nesse período podem acarretar no sistema nervoso central, levando a mudanças comportamentais e endócrinas que aparecerão na vida adulta. Esse modelo tem sido associado ao aparecimento de características relacionadas a comportamentos indicativos de depressão, de alteração no padrão alimentar e de ansiedade (WIGGER; NEUMANN, 1999; KALINICHEV *et al.*, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2005). Esse modelo de estresse neonatal poderia ser comparado ao estresse sofrido pelos recém-nascidos prematuros, que precisam ficar por um determinado período na incubadora, ficando assim afastados do contato materno.

As intervenções feitas no período neonatal influenciam a relação da mãe com os filhotes, e a mãe pode assumir determinados comportamentos que afetam o desenvolvimento do sistema nervoso dos filhotes. A frequência e a quantidade/qualidade do cuidado materno são importantes para o desenvolvimento de diversos comportamentos e alguns autores relatam que filhotes criados por mães que demonstram altos níveis de comportamento materno ou expostos a procedimentos de manipulação (LIU *et al.*, 1997; MACRI; MASON; WURBEL, 2004; BRANCHI; ALLEVA, 2006) mostram diminuição no comportamento do tipo ansioso na idade adulta (LEVINE, 1957; CALDJI *et al.*, 1998; WEAVER; MEANEY; SZYF, 2006). Muitos estudos têm mostrado que variações no comportamento materno produzem modificações fisiológicas (CIRULLI; BERRY; ALLEVA, 2003; LEVINE, 1957; LIU *et al.*,

1997; BRANCHI; ALLEVA, 2006) e sobre o comportamento, incluindo respostas emocionais (MEANEY, 2001; CUSHING; KRAMER, 2005; LEVINE, 2005) na ninhada adulta.

Outras pesquisas têm apontado a importância de um ambiente adequado para um desenvolvimento saudável, pois os recém-nascidos são mais vulneráveis nesse período. Assim, experimentos nesta área são de grande importância para futuramente relacionarmos eventos adversos na infância com o aparecimento de algumas patologias na vida adulta (BRANCHI; ALLEVA, 2006).

Em humanos, a ansiedade é definida como um sentimento vago e desagradável de medo, apreensão, caracterizado por tensão ou desconforto derivado de antecipação de perigo, de algo desconhecido ou estranho (CASTILLO *et al.*, 2000). A ansiedade não é em si um fenômeno patológico, ela cumpre um papel biologicamente útil, pois permite desencadear comportamentos adaptativos de diversos tipos (defesa, inibição, ataque, etc.). Entretanto, a ansiedade pode converter-se em um problema, quando não desempenha sua função de alarme psicobiológico adaptativo, tornando-se uma doença (DUARTE; HÜBNER, 1999).

Estudos de psiconeuroendocrinologia com animais demonstraram que ocorre redução da liberação de corticosterona em resposta ao estresse em animais repetidamente privados do contato materno durante a infância (LEVINE, 1962; MEANEY *et al.*, 1985a; DURAND *et al.*, 1998), devido ao aumento seletivo no receptor de glicocorticóides (MEANEY *et al.*, 1985b; MEANEY *et al.*, 1988; SARRIEAU; SHARMA; MEANEY, 1988; MEANEY *et al.*, 1989; O'DONNELL *et al.*, 1994), ocorrendo modificações do funcionamento da glândula adrenal.

O estrogênio é o hormônio responsável pelo aparecimento dos caracteres sexuais femininos e manutenção da gestação. Durante o ciclo menstrual em mulheres e estral em ratas, os níveis de estrogênio variam e isso pode influenciar parâmetros relacionados a alterações comportamentais (LANDÉN, ERIKSSON, 2003; LOVICK, 2006; de CHAVES *et al.*, 2009). Assim, os efeitos da manipulação neonatal poderiam ser mascarados ou modificados em função da fase do ciclo estral em que as ratas estão, uma vez que sabemos que variações nos níveis de hormônios, como o estradiol, podem influenciar o grau de ansiedade (BODO; RISSMAN, 2006). Uma solução para esse problema é a realização de ovariectomia, que consiste na retirada dos ovários, para que possamos analisar os resultados sem a interferência dos hormônios esteroidais.

O estresse neonatal e a variação hormonal podem ter forte influência no comportamento do indivíduo. Respostas adaptativas apresentadas na vida adulta podem ter sido geradas nas primeiras fases do desenvolvimento humano. Portanto, faz-se necessário a

investigação do impacto destes fatores, sendo importante para a prática clínica da Enfermagem compreender os fatores que podem influenciar o comportamento humano e, através desse conhecimento, aprimorar o cuidado de Enfermagem baseado em evidências. Para tal, o desenvolvimento de modelos em animais de experimentação pode ser útil para a compreensão das alterações observadas em pesquisa clínica.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral:**

O trabalho teve como objetivo geral verificar a associação entre a liberação de hormônios gonadais na puberdade e as alterações comportamentais observadas na idade adulta, em animais submetidos à manipulação neonatal.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

- a) Verificar os efeitos da ovariectomia em período anterior à puberdade sobre o comportamento do tipo ansioso na idade adulta, em ratas de ninhadas intactas e manipuladas no período neonatal;
- b) Verificar os efeitos da ovariectomia em período anterior à puberdade sobre a atividade locomotora e exploratória na idade adulta, em ratas de ninhadas intactas e manipuladas no período neonatal.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

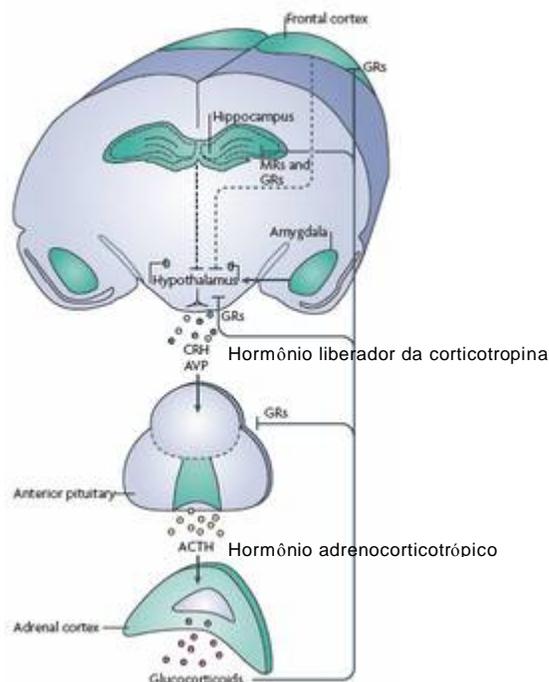
#### 3.1 Estresse Neonatal, Período Hiporresponsivo ao Estresse e a Relação Mãe-Filhote:

O período neonatal é crítico para o desenvolvimento neural dos filhotes. Eventos que ocorrem nesse período, como a separação materna, podem influenciar o comportamento desses animais na vida adulta. Dentre essas mudanças comportamentais encontram-se alterações no comportamento do tipo ansioso.

O desenvolvimento de um determinado comportamento resulta de interações genéticas e ambientais. Acontecimentos no período pós-natal, como os estímulos estressantes, podem alterar o desenvolvimento neural e o comportamento de um animal adulto (GONZÁLES *et al.*, 1990). Vários estressores ou mudanças ambientais na infância têm sido associados a sérios problemas psiquiátricos na vida adulta, como ansiedade, depressão e distúrbios na alimentação (HERZOG *et al.*, 1993; RORTY; YAGER, 1996).

As primeiras duas semanas de vida de um rato correspondem ao período perinatal humano. Durante essa fase, continua a ocorrer o desenvolvimento de vários sistemas, incluindo o sistema nervoso central (SNC). Esses primeiros dias constituem o chamado período hiporresponsivo ao estresse (SAPOLSKY; MEANEY, 1986), uma vez que há uma exacerbação do mecanismo de retroalimentação negativa dos glicocorticóides na hipófise e diminuição da sensibilidade da adrenal ao hormônio adrenocorticotrópico, o ACTH (YOSHIMURA *et al.*, 2003).

Foi encontrada também uma maior concentração de receptores glicocorticóides no hipocampo (MEANEY *et al.*, 1989), um aumento da inibição mediada pelo hipocampo e diminuição da excitação mediada pela amígdala na resposta neuroendócrina do eixo Hipotálamo-Hipófise-adrenal (HHA, Figura 1) nos animais que sofreram estresse neonatal (de KLOET *et al.*, 1998).



(LUPIEN *et al.*, 2009)

Figura 1: Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA). Estímulos ambientais externos são captados pelo sistema límbico, ativando os sistemas de resposta ao estresse, entre eles o eixo HHA.

A estimulação neonatal em ratos consiste tipicamente na “manipulação” diária dos filhotes por alguns minutos no período que abrange as primeiras duas semanas de vida. Por outro lado, a separação (ou privação) materna consiste da separação dos filhotes por períodos mais prolongados, isto é, de mais de 30 minutos (LIU *et al.*, 1997).

A manipulação tem como consequência na vida adulta uma série de alterações comportamentais e endócrinas que se caracterizam por uma diminuição do medo a novos ambientes. Além disso, esses animais na idade adulta, apresentam uma resposta menos acentuada da secreção de glicocorticóides pela adrenal quando expostos a estímulos estressores (LEVINE, 1993; MEANEY *et al.*, 1993). Contudo, os níveis basais de corticosterona de animais manipulados e não-manipulados não diferem entre si na idade adulta, mas as diferenças entre eles parecem ser devidas a uma sensibilidade diferencial do sistema nervoso central ao mecanismo de retroalimentação negativa da adrenal (LEVINE, 1994).

Vários estudos demonstraram que a manipulação ou qualquer outro tipo de estimulação do animal no período neonatal provoca um distúrbio da relação mãe-filhote. As mães de filhotes manipulados lambem mais a sua prole do que mães de filhotes não-manipulados. Esse comportamento da mãe em relação ao filhote afeta o desenvolvimento do sistema nervoso deste (LEVINE, 1994). O distúrbio dessa interação mãe-filhote promove uma

série de respostas comportamentais e fisiológicas que incluem mudanças na temperatura corporal, na locomoção, na frequência cardíaca e na reação emocional (HINDE; SPENCER-BOOTH, 1971). Foi demonstrado que, além de mudanças fisiológicas, há alterações bioquímicas em animais que sofreram privação materna, tais como redução da atividade da ornitina descarboxilase e dos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) em certas regiões cerebrais (SCHANBERG; KUHN, 1985).

A estimulação pós-natal aumenta a expressão de receptores para glicocorticóides no hipocampo e córtex frontal, duas regiões que estão envolvidas na regulação, por meio de um sistema de retroalimentação, da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (FRANCIS *et al.*, 1996). No entanto, períodos de separação maternal mais prolongados, por cerca de 180 minutos, produzem uma diminuição da concentração dos receptores de glicocorticóides no hipotálamo, córtex frontal e hipocampo (LIU *et al.*, 1997).

Os estudos acima nos indicam que o desenvolvimento dos sistemas de receptores para glicocorticóides em determinadas regiões do sistema nervoso são sensíveis a uma variedade de sinais ambientais durante o período pós-natal, ou seja, o ambiente na fase neonatal pode determinar a responsividade do eixo HHA ao estresse por toda a vida do animal.

### **3.2 Ciclo Estral:**

O ciclo estral de ratas tem duração de quatro a cinco dias e é caracterizado por quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro, as quais podem ser determinadas pelos tipos celulares observados no esfregaço vaginal (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

De acordo com Medeiros *et al* (2008), o proestro dura de 12 a 14 horas e é a fase de grandes alterações hormonais, ocorrendo picos de hormônio luteinizante (LH), prolactina (PRL) e hormônio folículo-estimulante (FSH). O estro é o período de 25 a 27 horas em que a rata está receptiva para a cópula, sendo na manhã desta fase que ocorre a ovulação. Se não houver a concepção, o ciclo continua com o metaestro, cerca de seis a oito horas e diestro que dura de 55 a 57 horas.

Estudos demonstram que o estradiol diminui a ansiedade e produz efeito antidepressivo em animais. Animais no proestro têm altos níveis de estradiol, diminuição do comportamento do tipo ansioso nas tarefas comportamentais e diminuição do tempo de imobilidade no teste de nado forçado comparados a fêmeas em diestro, que têm menores níveis circulantes de estradiol do que no proestro (FRYE; PETRALIA; RHODES, 2000;

FRYE, WALF, 2002). Além disso, a administração de estradiol em ratas ovariectomizadas produz efeito ansiolítico e antidepressivo quando comparadas a animais não-tratados (WALF; FRYE, 2005). Os níveis de estrogênio e progesterona mudam ao longo do ciclo estral, de modo que os níveis são elevados quando as fêmeas estão no estro, e baixos quando em diestro. Essas alterações hormonais podem estar associadas com alterações comportamentais, especialmente com a ansiedade. Altos níveis de progesterona durante a fase lútea são relacionados com a coordenação motora, melhora/aprimoramento visual, memória perceptual e verbal. O estro vaginal ocorre após a ovulação e coincide com a formação do corpo lúteo (NELSON, 2005). Progesterona melhora a atenção, a memória implícita e desempenho nas tarefas relacionadas ao lobo frontal, quando os níveis são elevados (LLANEZA; FRYE, 2009). Esses achados sugerem que hormônios gonadais modulam o comportamento emocional em ratas fêmeas (CHAVES *et al.*, 2009).

Em humanos, a depressão e a ansiedade estão entre os mais citados sintomas psicológicos relacionados à ausência de hormônios ovarianos que são observados em mulheres na pós-menopausa (PAOLETTI *et al.*, 2001). Nesse período as mulheres sofrem um declínio de níveis circulantes de estradiol (CHAVES *et al.*, 2009).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Tipo de Estudo:

Trata-se de um estudo experimental (POLIT; BECK; HUNGLER, 2004) com um grupo de filhotes de ratos manipulados e um grupo controle não manipulado. Este trabalho faz parte do projeto **“Influência de hormônios gonadais sobre o desenvolvimento de mudanças comportamentais e neuroquímicas na idade adulta em animais manipulados no período neonatal”** desenvolvido no Departamento de Bioquímica, e que foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), e pela Comissão de Ética para estudos em animais desta Universidade, projeto número 18398.

### 4.2 Campo de Estudo:

O Estudo foi realizado no Grupo de Neurobiologia do Estresse do Departamento de Bioquímica da UFRGS, Laboratório 37, coordenado pela Prof. Dra. Carla Dalmaz. O Grupo tem trabalhado no sentido de pesquisar os efeitos do estresse, em especial quando crônico, por meio de modelos experimentais em animais. Em nosso laboratório, temos estudado os efeitos comportamentais induzidos por diferentes modelos de estresse em ratos. Paralelamente, efeitos neuroquímicos que possam estar relacionados aos efeitos comportamentais observados também são estudados.

### 4.3 População e Amostra:

O número de animais calculado por grupo (usando um poder de 80%, diferença da média de 50%, desvio de 35% para os experimentos comportamentais) foi para um n de 11 por grupo. O cálculo do tamanho amostral considerou estudos prévios (MARGIS *et al.*, 2004; ZIEGLER *et al.*, 2005; BARRERA *et al.*, 2005; OVERHOLSER; SOWINSKI, 2007; de MUTH, 2009; NOSCHANG *et al.*, 2009a; NOSCHANG *et al.*, 2009b; SOMERA-MOLINA *et al.*, 2009). Foram utilizadas aproximadamente 22 ratas prenhes, provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os animais serão submetidos a um ciclo normal claro/escuro de 12 horas, com ração padronizada e água *“ad libitum”*. A partir destas obtivemos um número estimado, partindo do princípio de que cada ninhada teve em média 4 machos e 4 fêmeas. No máximo um animal por ninhada foi utilizado por grupo para evitar o viés *“ninhada”* (ZAR, 1996). O quadro 1 apresenta a divisão e subdivisão da amostra.

CONTROLE			MANIPULADO NO PERÍODO NEONATAL		
ovariectomizada	<i>sham</i>	controle	ovariectomizada	<i>sham</i>	controle

Quadro 1 – Divisão e subdivisão da amostra.

#### 4.4 Coleta dos Dados:

Os dados foram coletados através de protocolos de experimentos comportamentais para animais de laboratório, como se expõe a seguir.

##### 4.4.1 Estresse neonatal

As ninhadas foram divididas em dois grupos:

Controles (não-manipuladas): permaneceram sem qualquer tipo de manipulação até o desmame.

Manipuladas: os filhotes sofreram separação de suas mães durante 10 minutos por dia do 1° ao 10° dia de vida. A mãe foi gentilmente afastada da ninhada, e em seguida todos os filhotes foram retirados do ninho ao mesmo tempo, sendo imediatamente colocados em uma incubadora com temperatura de 32°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), enquanto a mãe permanecia na caixa moradia e na mesma sala da incubadora.

O dia do nascimento foi considerado dia zero. Os animais foram desmamados aos 21 dias de vida e mantidos em grupos de 4 ou 5 por caixa, sendo separados entre machos e fêmeas. Somente as fêmeas foram utilizados neste estudo, sendo os machos utilizados para outro projeto. Os testes comportamentais iniciaram entre os 60 e 80 dias de vida, quando já adultos (figura 2).



Figura 2: Incubadora onde foi realizada a manipulação neonatal.

#### 4.4.2 Ovariectomia

Também conhecida como ooforectomia, é a remoção dos ovários (MEEKER; ROTHROCK, 1997). Em animais é utilizada a terminologia ovariectomia.

No presente estudo, os animais foram divididos em 2 grupos principais e 6 subgrupos: controle (controle, ovariectomia e *sham*) e manipulado no período neonatal (controle, ovariectomia e *sham*). A ovariectomia foi realizada entre os 24 e 28 dias de vida dos animais. Assim, para cada ninhada, uma fêmea foi submetida à ovariectomia bilateral (grupo OVX), uma fêmea foi submetida à cirurgia *sham* ou falsa ovariectomia, para simulação do estresse cirúrgico (grupo *SHAM*) (JAIME *et al.*, 2005) e uma fêmea (grupo INTACTO) não foi submetida à cirurgia. Foram utilizadas apenas uma fêmea por ninhada em cada grupo. Para as cirurgias: após anestesia com cetamina/xilazina, depilação da região abdominal medial e assepsia com álcool iodado, a pele e a musculatura foram incisadas longitudinalmente, na linha média, próximo ao nível dos rins, abaixo da última costela, e o ovário foi identificado e exposto. No grupo OVX, se realizou a hemostasia através da ligação da parte superior da trompa com fio e excisão ovariana juntamente com a gordura circundante. Foi realizada a sutura da camada muscular e da pele com fio de sutura. No grupo *SHAM*, após a exposição do ovário, foi feita a recolocação dos órgãos na cavidade abdominal e sutura (JAIME *et al.*, 2005). Os animais ficaram em ambiente aquecido até recuperação da anestesia.

#### 4.4.3 Labirinto em Cruz Elevado (*Plus Maze*)

Essa foi a primeira tarefa a qual os animais foram submetidos. O teste consiste em colocar o animal no centro de um labirinto em formato de cruz, onde dois braços possuem paredes laterais, não permitindo que o animal tenha contato visual com o exterior. Os outros dois braços da cruz possuem as laterais abertas permitindo ao animal uma visão para o exterior, bem como a possibilidade de colocar a cabeça para o lado de fora do braço, dando-lhe a noção da altura (70 cm). O teste baseia-se no fato de que animais mais ansiosos permanecem mais tempo nos braços fechados, onde se sentem mais protegidos, explorando menos os braços abertos. Cada animal foi avaliado por um tempo de 5 minutos, em sala com uma luz vermelha. Após a retirada dos ratos do labirinto, este foi cuidadosamente limpo para colocação do próximo animal. Os comportamentos que foram avaliados neste experimento são os seguintes:

Permanência no braço fechado: foi avaliado o tempo total de permanência do animal no braço fechado; também foi medida a frequência de entradas (número de vezes que o animal entrou no braço fechado).

Permanência no braço aberto: foi avaliado o tempo total de permanência do animal no braço aberto; também foi medida a frequência de entradas (número de vezes que o animal entrou no braço aberto) (SILVEIRA *et al.*, 2005).

Bolos fecais: número de bolos fecais que o animal produziu.

De acordo com a figura 3.



Figura 3: Labirinto em Cruz Elevado (*Plus Maze*).

#### 4.4.4 Campo Aberto (*Open Field*)

Essa tarefa foi realizada 2 dias após o Labirinto em Cruz Elevado. O experimento consiste em analisar cada animal por um período de 5 minutos, em 2 dias consecutivos, em um aparato com base retangular, medindo 60x40x50cm com 12 divisões marcadas no chão do aparato medindo 15x13,3 cm cada uma, sendo que a parede frontal do campo aberto é de vidro, permitindo a visualização do animal pelo experimentador. Após a análise experimental de cada animal o aparato foi totalmente limpo. Os seguintes parâmetros foram analisados:

Locomoção: foram avaliadas a frequência de cruzamentos (número de vezes que o animal cruzou as divisões marcadas no chão), uma medida de atividade exploratória.

Tempo nos quadrados centrais: foi avaliado o tempo de permanência na parte central do campo aberto em relação ao tempo despendido na periferia, um parâmetro de ansiedade.

Atividade de levantar, ou de orientação (*rearings*): foi avaliada a frequência (número total de vezes que o animal levantou sobre as patas dianteiras e movimentou a cabeça numa postura típica de orientação em um ambiente novo) (SILVEIRA *et al.*, 2005). De acordo com a figura 4.

Atividade de limpeza (*grooming*): é a atividade de esfregar o corpo com as patas ou boca e esfregar a cabeça com as patas, num comportamento característico de limpeza (figura 5). Foi mensurado o tempo que o animal ficou realizando esse comportamento (BRANCHI; ALLEVA, 2006).

Bolos fecais: número de bolos fecais que o animal produziu.



Figura 4: Campo Aberto (*Open Field*), na figura mostra um animal realizando *rearing* (resposta de orientação).



Figura 5: *Grooming* (auto limpeza)

#### 4.4.5 Teste do Conflito

Essa foi a última tarefa a qual os animais foram submetidos. Esse teste foi adaptado em nosso laboratório de acordo com Ducottet e Belzung (2004). Um dia antes desse experimento, o animal recebeu *pellets* de chocolate em sua caixa-moradia, a fim de familiarizar-se com esse tipo de alimento palatável e seu odor. No dia do teste, o animal foi colocado em uma caixa transparente, medindo 60 x 30cm e 43 cm de altura, que dispõe de duas plataformas, em lados opostos, afastadas uma da outra por uma distância de 35 cm. A plataforma onde se coloca o rato mede 18 x 13,5 cm e 11,5 cm de altura; a plataforma onde se coloca os *pellets* de chocolate tem 10 cm de diâmetro e 10,5 cm de altura. Foram colocados 5 *pellets* pesando aproximadamente 20 g, em cada sessão. Na outra plataforma foi colocado gentilmente o animal. O chão deste aparato foi coberto por água e maravalha. Durante cinco minutos foram analisados: tempo de latência para deixar a plataforma chegando à maravalha molhada; latência para alcançar a plataforma com o chocolate; tempo que o animal permaneceu na maravalha molhada; número de investidas ao alimento (respostas de orientação com as patas apoiadas na plataforma e o focinho direcionado ao chocolate); número de respostas de orientação, tempo para começar a comer, tempo de *grooming*. De acordo com as figuras 6 e 7.



Figura 6: Teste do conflito, rato sobre a plataforma.



Figura 7: Teste do conflito, animal realizando *rearing*.

#### 4.5 Análise dos Dados:

Os dados foram expressos como média e erro padrão da média (E.P.M.). As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas por Análise de Variância de Duas Vias (ANOVA) (tomadas a manipulação neonatal e a cirurgia como as duas variáveis), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan (ZAR, 1996).

#### 4.6 Aspectos Éticos:

Este projeto fez parte de um projeto maior no Departamento de Bioquímica. O projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), e pela Comissão de ética para estudos em animais da Universidade, projeto número 18398 (Anexo A) e pela Comissão de Pesquisa da Escola de enfermagem – COMPESQ (Anexo B).

Os procedimentos propostos por esse projeto são de uso habitual por autores que trabalham e publicam na área. Obedecem as normas propostas pelos Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (GOLDIM; RAYMUNDO, 1997). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento, bem como reduzir o número de animais utilizados nesse estudo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1. Labirinto em Cruz Elevado (*Plus Maze*):

Esta tarefa foi utilizada como um parâmetro de comportamento do tipo ansioso dos animais. Esse teste foi avaliado em 5 minutos, durante esse tempo foram mensurados os seguintes parâmetros: tempo no braço fechado; tempo no braço aberto; número de entradas no braço fechado; número de entradas no braço aberto; número de bolos fecais. Os dados foram analisados por meio de Análise de Variância de Duas Vias (ANOVA), utilizando estresse e cirurgia como fatores fixos e tempo no braço fechado, tempo no braço aberto, número de entradas no braço fechado, número de entradas no braço aberto e número de bolos fecais como variáveis dependentes. Para esse experimento houve um N de 10-14 animais por grupo, totalizando N= 69.

Conforme observado na figura 8, houve um efeito da manipulação, mostrando que os animais não manipulados produzem mais bolos fecais [ $F(1, 69) = 5,802$ ;  $P = 0,019$ ]. Não houve efeito da cirurgia sobre esse parâmetro [ $F(2, 69) = 0,791$ ;  $P > 0,05$ ] ou interação.

Não foram encontradas diferenças significativas nos demais parâmetros analisados (figuras 9 a 12)  $P > 0,05$ . ANOVA de duas vias.

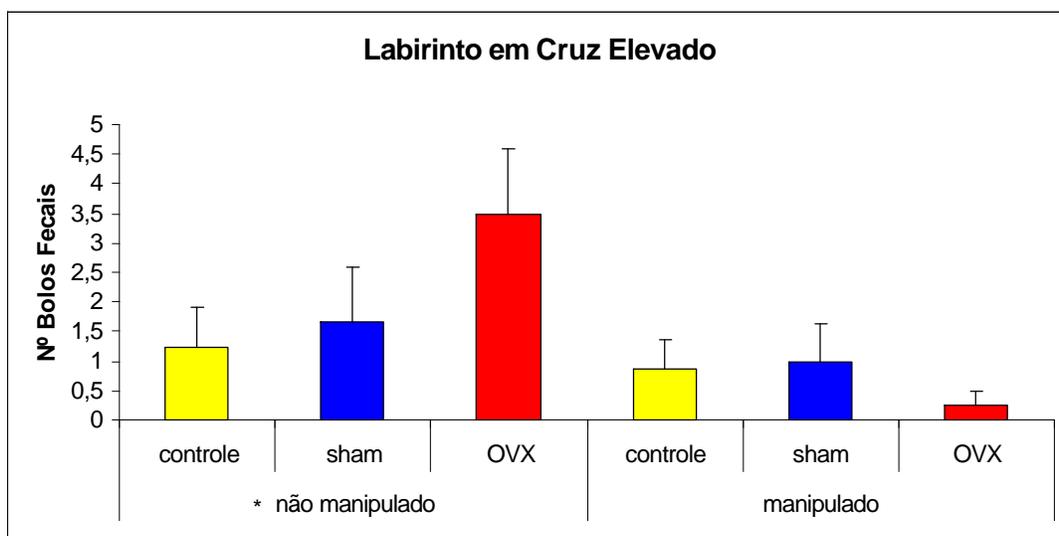


Figura 8: Número de bolos fecais. \*ANOVA de duas vias, mostrando efeito do estresse [ $F(1, 69) = 5,802$ ;  $P = 0,019$ ], mas sem efeito da cirurgia [ $F(2, 69) = 0,791$ ;  $P > 0,05$ ]. N= 10 - 14 animais/grupo.

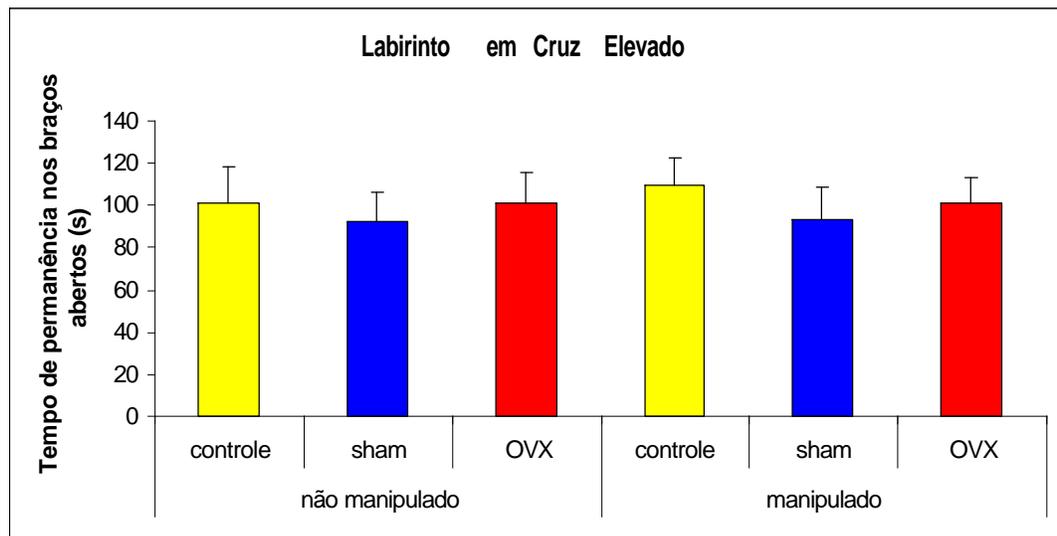


Figura 9: Tempo de permanência nos braços abertos. ANOVA de duas vias, não houve efeito do estresse [ $F(1, 69) = 0,217$ ;  $P > 0,05$ ], nem da cirurgia [ $F(2, 69) = 0,570$ ;  $P > 0,05$ ].  $N = 10 - 14$  animais/grupo.

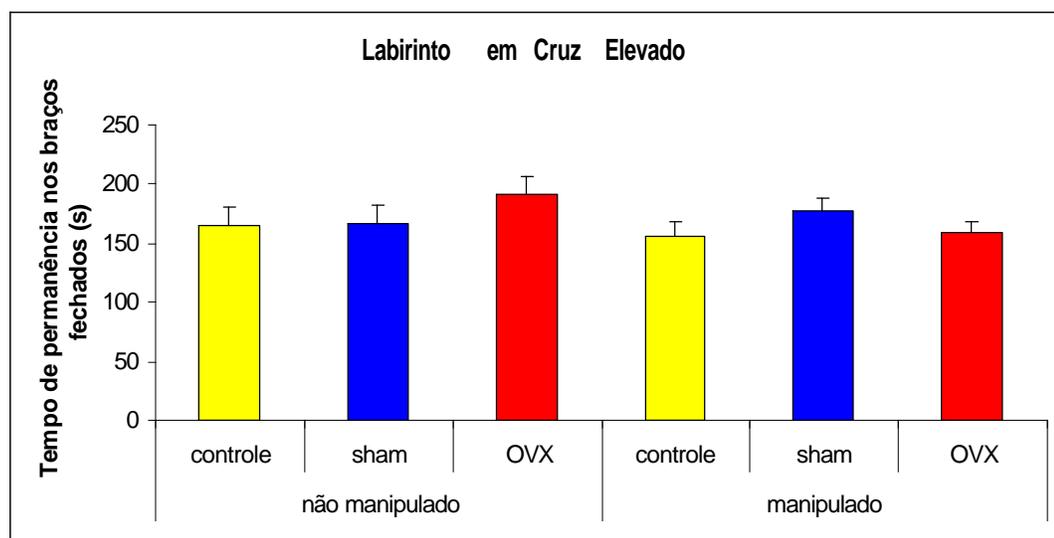


Figura 10: Tempo de permanência nos braços fechados. ANOVA de duas vias, não houve efeito do estresse [ $F(1, 69) = 1,010$ ;  $P > 0,05$ ], nem da cirurgia [ $F(2, 69) = 0,748$ ;  $P > 0,05$ ].  $N = 10 - 14$  animais/grupo.

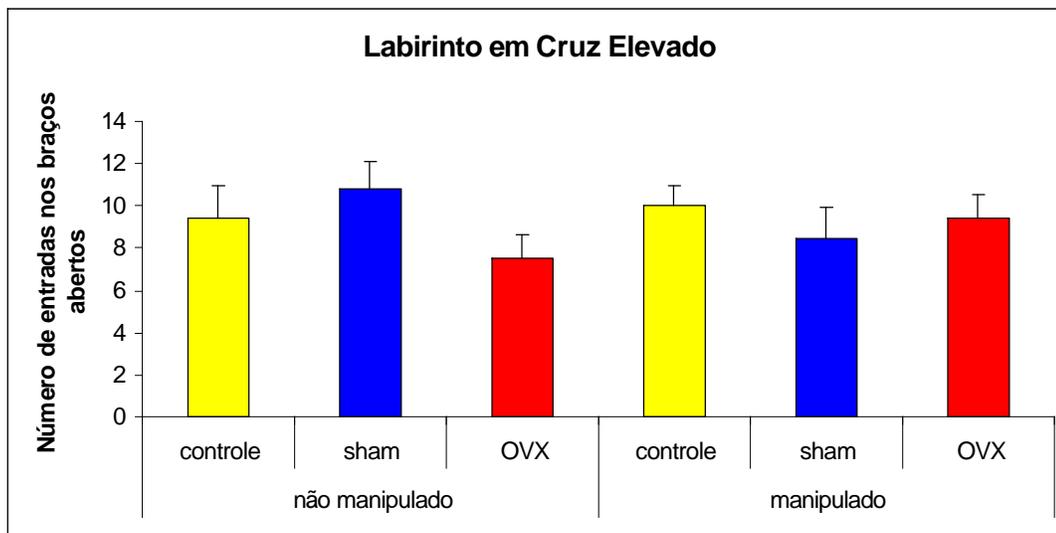


Figura 11: Número de entradas nos braços abertos. ANOVA de duas vias, não houve efeito do estresse [ $F(1, 69) = 0,003$ ;  $P > 0,05$ ], nem da cirurgia [ $F(2, 69) = 0,622$   $P > 0,05$ ].  $N = 10 - 14$  animais/grupo.

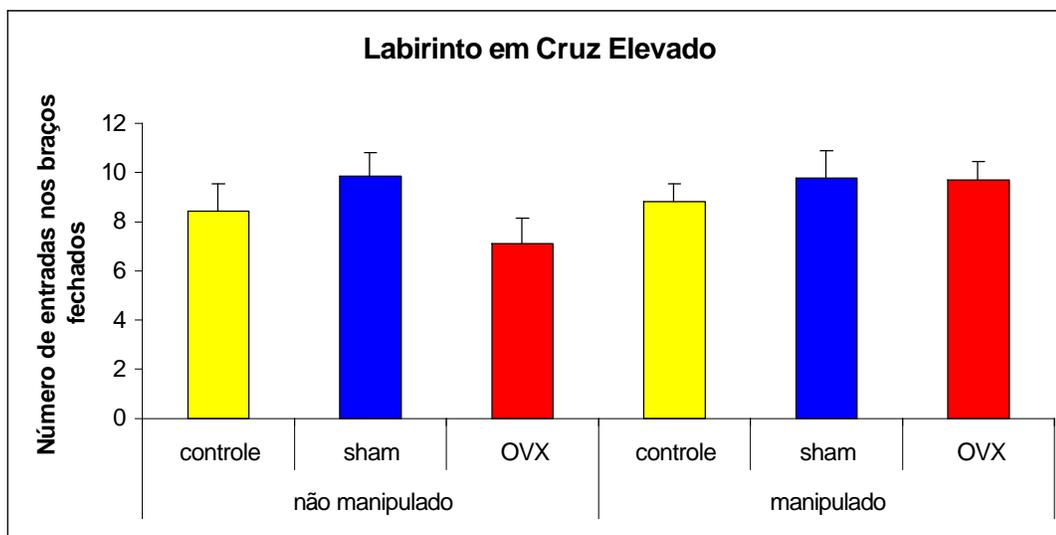


Figura 12: Número de entradas nos braços fechados. ANOVA de duas vias, não houve efeito do estresse [ $F(1, 69) = 1,177$ ;  $P > 0,05$ ], nem da cirurgia [ $F(2, 69) = 1,392$   $P > 0,05$ ].  $N = 10 - 14$  animais/grupo.

## 5.2. Campo Aberto (*Open Field*):

Esta tarefa foi utilizada como um parâmetro de avaliação do comportamento do tipo ansioso e da atividade locomotora dos animais, assim como da memória de habituação para este ambiente. Esse teste foi avaliado em 5 minutos e durante esse tempo foram mensurados os seguintes parâmetros: número de cruzamentos (*crossings*), respostas de orientação, ou atividade de levantar (*rearings*), tempo nos quadrados centrais (como medida de ansiedade), tempo de auto-limpeza (*groomings*) e número de bolos fecais. O teste foi realizado em dois dias. Os dados foram analisados por meio de uma análise de variância de medida repetida (ANOVA de medidas repetidas), utilizando como variável independente estresse e cirurgia e como variável dependente: número de cruzamentos (*crossings*), respostas de orientação, ou atividade de levantar (*rearings*), tempo nos quadrados centrais, tempo de auto-limpeza (*groomings*) e número de bolos fecais. Para esse experimento houve um N de 10-14 animais por grupo, totalizando N= 69.

Conforme observado na figura 13, os animais manipulados apresentaram mais respostas de orientação, mostrando efeito do estresse [ $F(1, 63) = 4,380$ ;  $P = 0,04$ ], mas sem efeito da cirurgia [ $F(2, 63) = 0,949$ ;  $P > 0,05$ ]. Ambos os grupos apresentaram memória de exposição ao campo aberto. Houve efeito da sessão, o dia 1 foi diferente do dia 2, [ $F(1, 63) = 10,116$ ;  $P = 0,002$ ], não havendo interação entre as variáveis Estresse e Cirurgia. ANOVA de medidas repetidas. N= 10 - 14 animais/grupo.

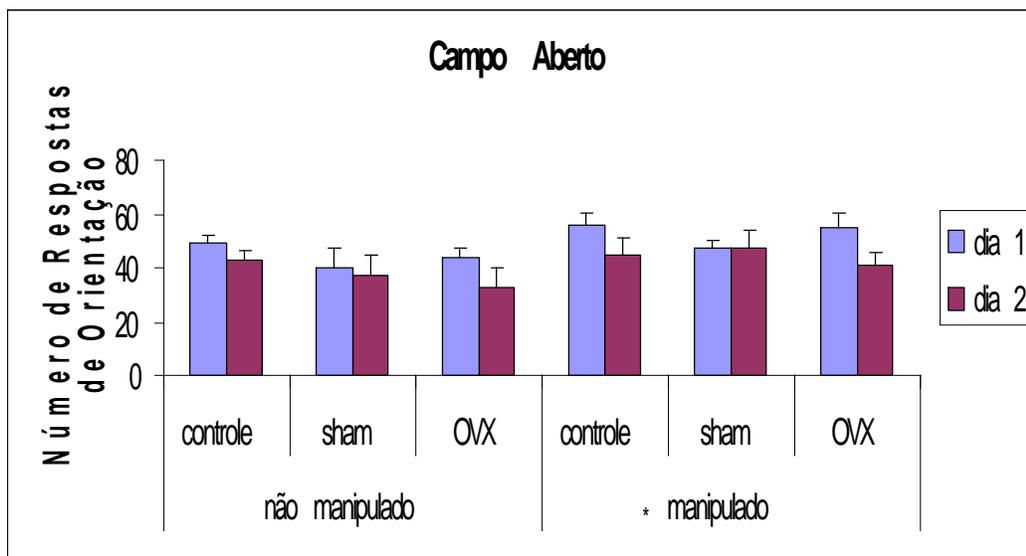


Figura 13: Número de respostas de orientação. \*ANOVA de medidas repetidas, mostrando efeito do estresse [ $F(1, 63) = 4,380$ ;  $P = 0,04$ ], mas sem efeito da cirurgia [ $F(2, 63) = 0,949$ ;  $P > 0,05$ ]. Houve efeito da sessão, [ $F(1, 63) = 10,116$ ;  $P = 0,002$ ], não havendo interação entre as variáveis.  $N = 10 - 14$  animais/grupo.

Na figura 14 podemos observar que os animais manipulados apresentaram um maior número de cruzamentos, mostrando efeito do estresse [ $F(1, 63) = 3,916$ ;  $P = 0,052$ ], mas sem efeito da cirurgia [ $F(2, 63) = 0,784$ ;  $P > 0,05$ ]. Ambos os grupos apresentaram memória da exposição ao campo aberto. Houve efeito da sessão, o dia 1 foi diferente do dia 2, [ $F(1, 63) = 15,96681$ ;  $P = 0,000171$ ], não havendo interação entre as variáveis. ANOVA de medidas repetidas.  $N = 10 - 14$  animais/grupo.

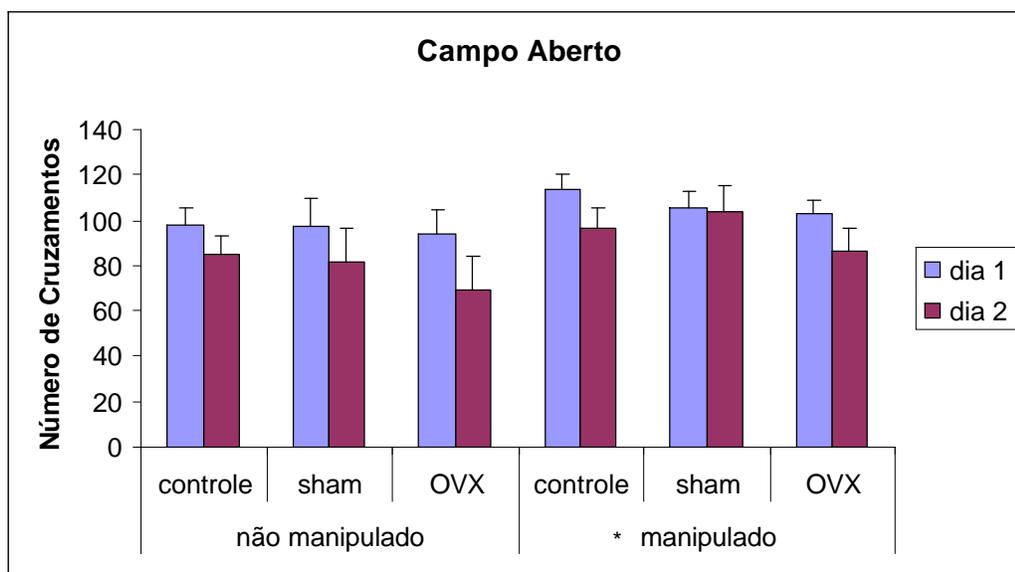


Figura 14: Número de cruzamentos. \*ANOVA de medidas repetidas, mostrando efeito do estresse [ $F(1, 63) = 3,916$ ;  $P = 0,052$ ], mas sem efeito da cirurgia [ $F(2, 63) = 0,784$ ;  $P > 0,05$ ]. Houve efeito da sessão [ $F(1, 63) = 15,96681$ ;  $P = 0,000171$ ], não havendo interação entre as variáveis.  $N = 10 - 14$  animais/grupo

Na figura 15 podemos observar que houve efeito do estresse sobre o comportamento de auto-limpeza (*grooming*) [ $F(1, 69) = 5,003$ ;  $P > 0,029$ ], mas sem efeito da cirurgia [ $F(2, 69) = 1,891$   $P > 0,05$ ].  $N = 10 - 14$  animais/grupo.

Não foram encontradas diferenças significativas nos demais parâmetros analisados (figura 16 e 17)  $P > 0,05$ .

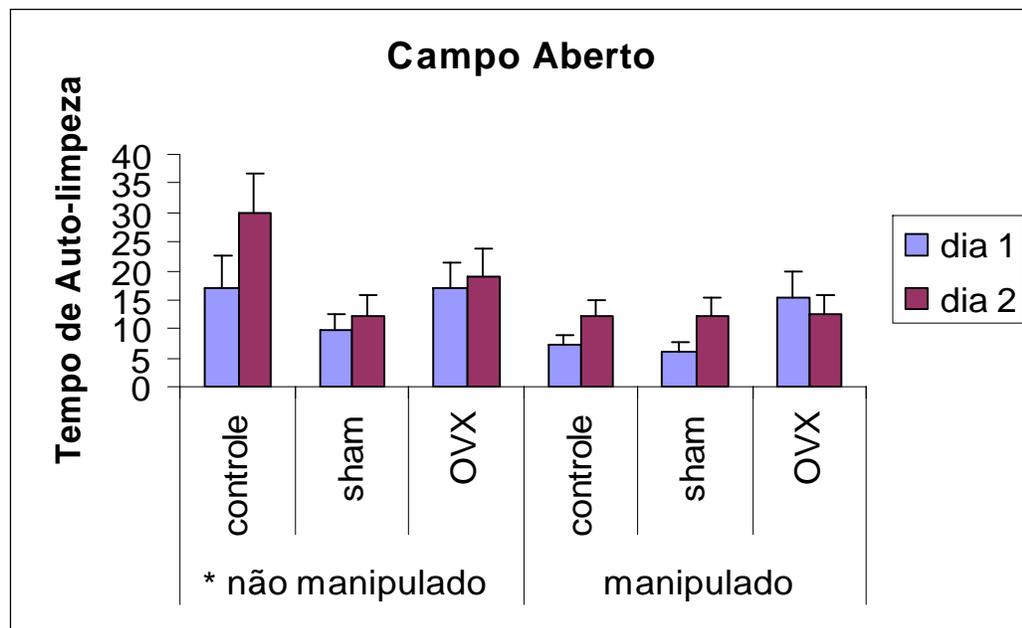


Figura 15: Tempo de auto-limpeza (*grooming*). \*ANOVA de medidas repetidas, mostrando efeito do estresse [ $F(1, 69) = 5,003$ ;  $P = 0,029$ ], mas sem efeito da cirurgia [ $F(2, 69) = 1,891$   $P > 0,05$ ].  $N = 10 - 14$  animais/grupo.

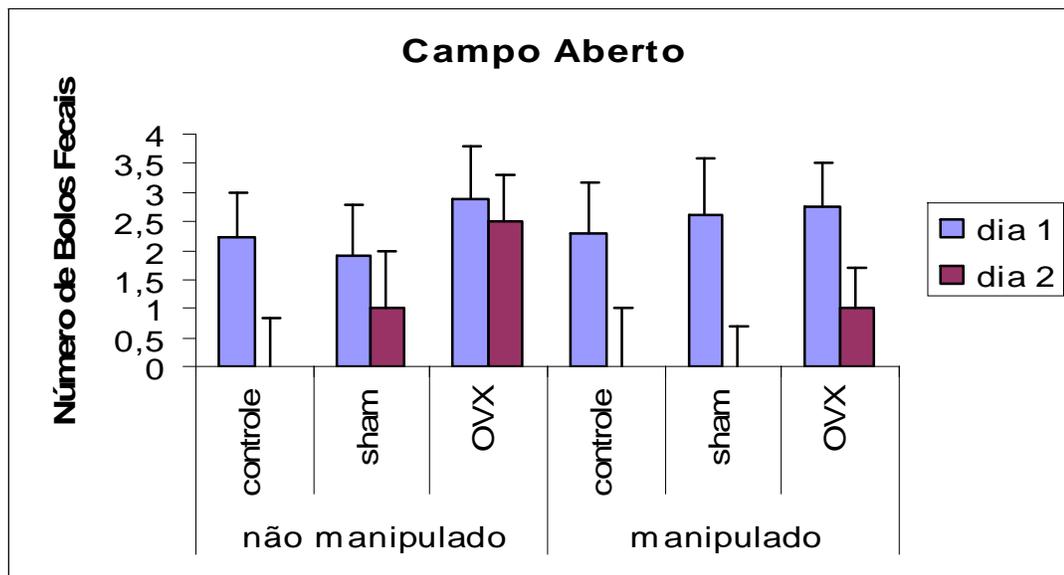


Figura 16: Número de bolos fecais. ANOVA de medidas repetidas, não houve efeito do estresse [ $F(1, 69) = 0,119$ ;  $P > 0,05$ ], nem da cirurgia [ $F(2, 69) = 0,226$   $P > 0,05$ ].  $N = 10 - 14$  animais/grupo.

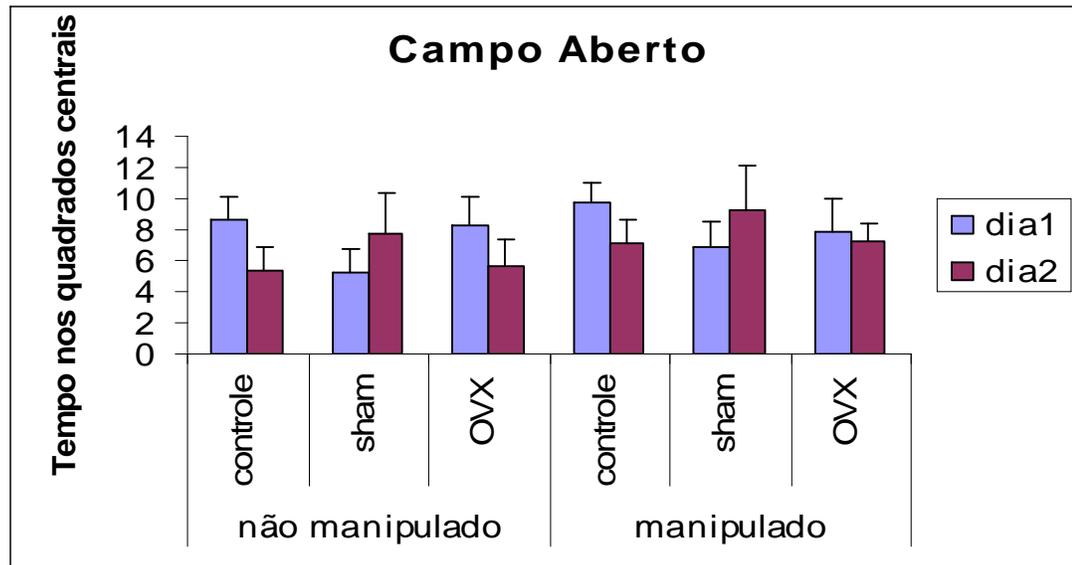


Figura 17: Tempo nos quadrados centrais. ANOVA de medidas repetidas, não houve efeito do estresse [ $F(1, 69) = 1,210$ ;  $P > 0,05$ ], nem da cirurgia [ $F(2, 69) = 0,084$   $P > 0,05$ ].  $N = 10 - 14$  animais/grupo.

### 5.3. Teste do Conflito:

Esse teste foi avaliado em 5 minutos, e durante esse tempo foram mensurados os seguintes parâmetros: latência para o rato sair plataforma 1, latência para o rato alcançar a plataforma 2, latência para começar comer, tempo total que o rato permanece na maravalha molhada, número de investidas, número de respostas de orientação (*rearings*) e frequência de auto-limpeza (*grooming*).

Os dados foram analisados por meio de Análise de Variância de Duas Vias (ANOVA), utilizando estresse e cirurgia como fatores fixos e latência para o rato sair plataforma 1, latência para o rato alcançar plataforma 2, latência para começar comer, tempo total que o rato permanece na maravalha, número de investidas, frequência de respostas de orientação (*rearings*) e frequência de auto-limpeza (*grooming*) como variáveis dependentes. Para esse experimento houve um N de 5-13 animais por grupo, totalizando  $N = 48$ .

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em qualquer dos parâmetros avaliados (figura 18 a 24)  $P > 0,05$ . ANOVA de duas vias.

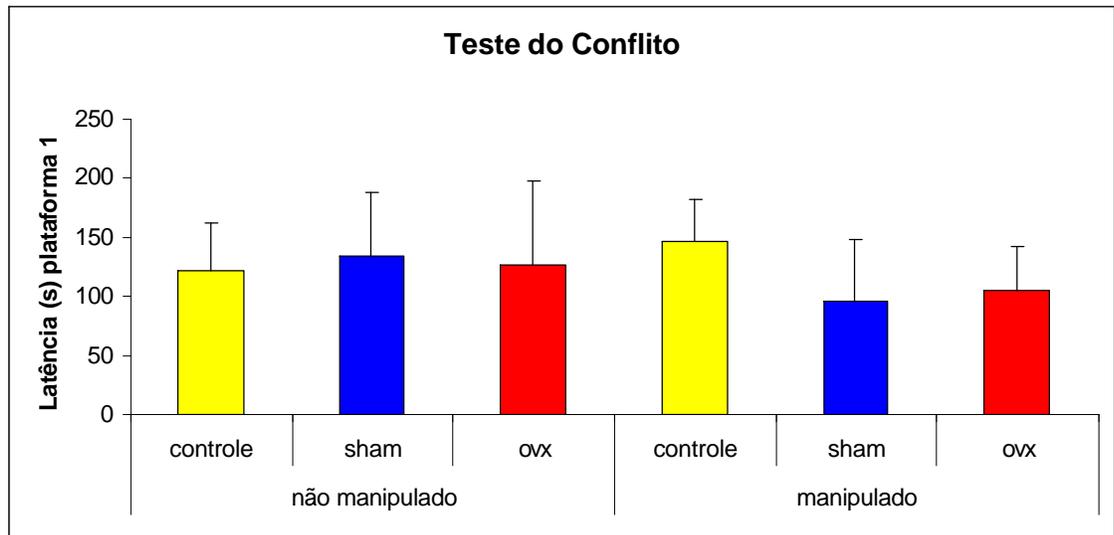


Figura 18: Latência para o rato sair plataforma 1. ANOVA de duas vias, não houve efeito do estresse [ $F(1, 48) = 0,96$ ;  $P > 0,05$ ], nem da cirurgia [ $F(2, 48) = 0,116$   $P > 0,05$ ].  $N = 5-13$  animais/grupo.

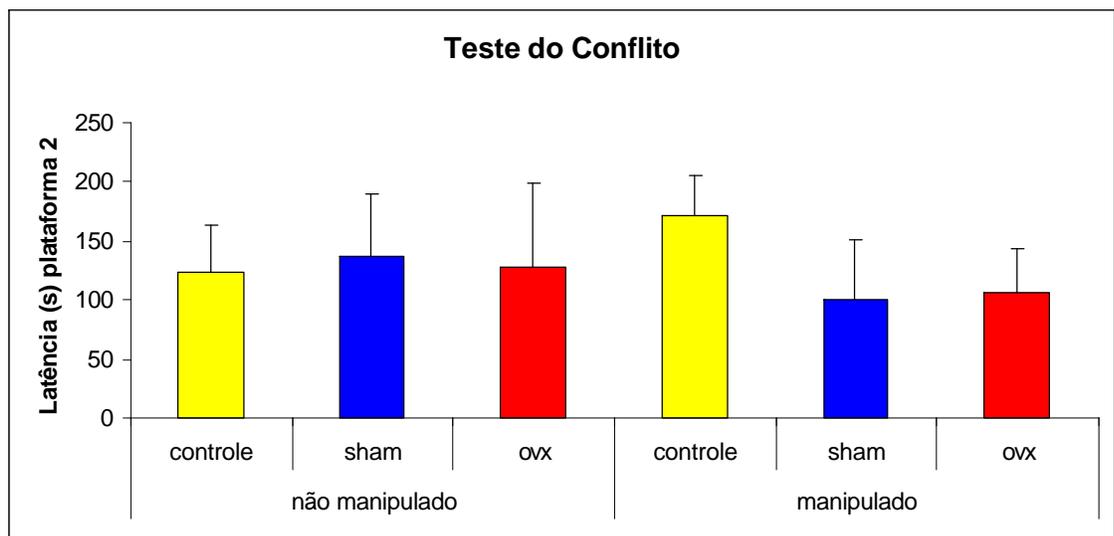


Figura 19: Latência para o rato alcançar plataforma 2. ANOVA de duas vias, não houve efeito do estresse [ $F(1, 48) = 0,010$ ;  $P > 0,05$ ], nem da cirurgia [ $F(2, 48) = 0,295$   $P > 0,05$ ].  $N = 5-13$  animais/grupo.

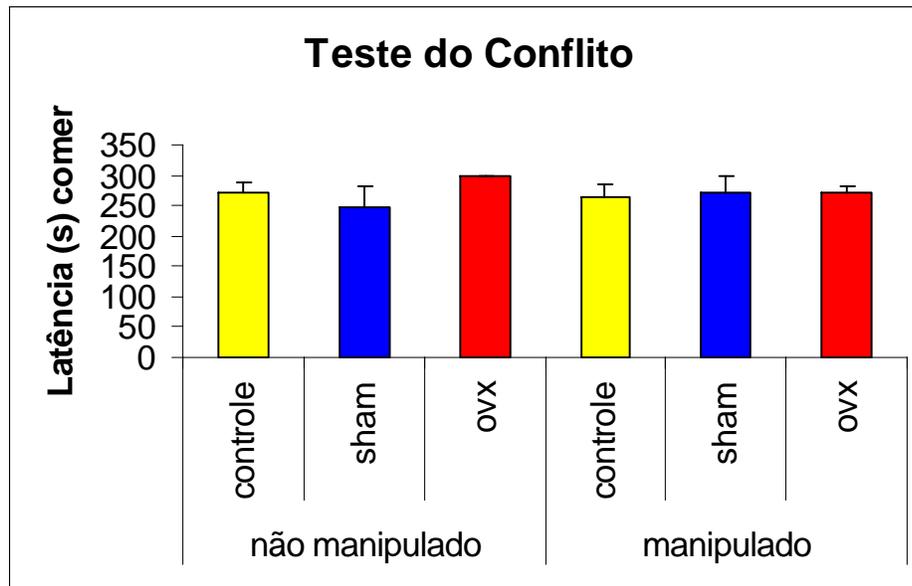


Figura 20: Latência para o rato começar comer. ANOVA de duas vias, não houve efeito do estresse [ $F(1, 48) = 0,40$ ;  $P > 0,05$ ], nem da cirurgia [ $F(2, 48) = 0,595$   $P > 0,05$ ].  $N = 5-13$  animais/grupo.

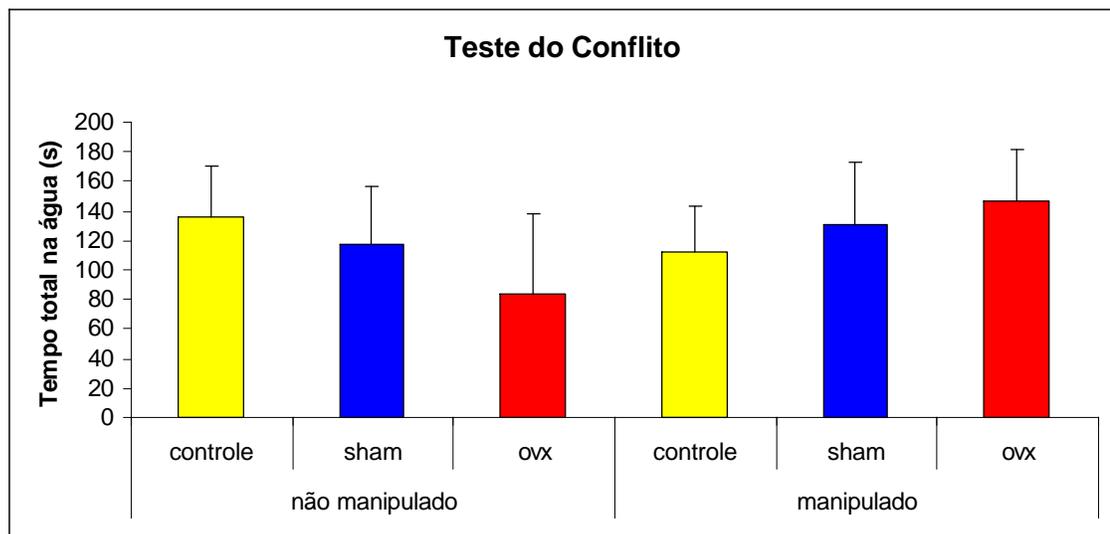


Figura 21: Tempo total que o rato permaneceu na água. ANOVA de duas vias, não houve efeito do estresse [ $F(1, 48) = 0,316$ ;  $P > 0,05$ ], nem da cirurgia [ $F(2, 48) = 0,029$   $P > 0,05$ ].  $N = 5-13$  animais/grupo.

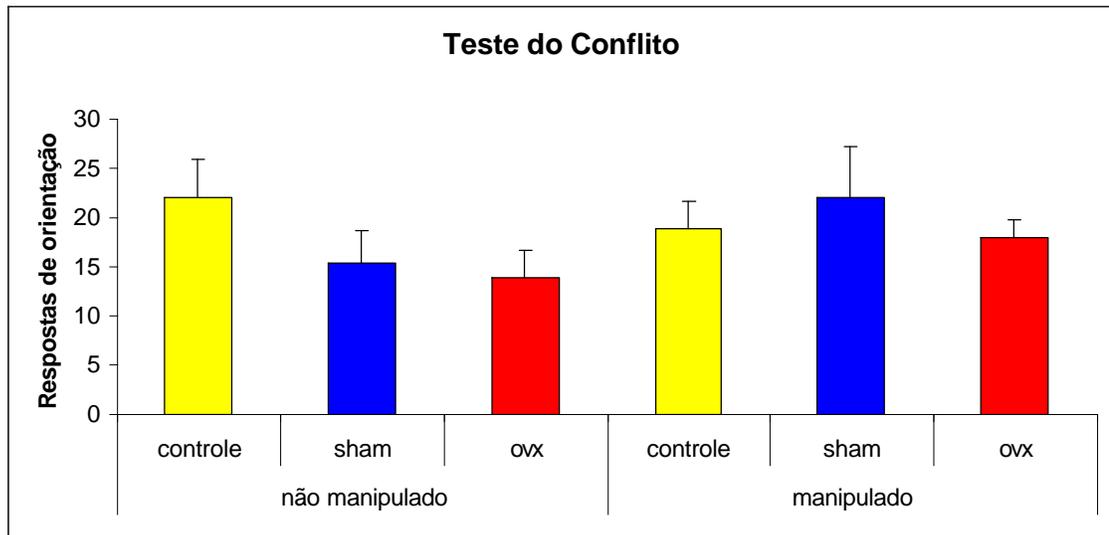


Figura 22: Número de respostas de orientação (*rearings*). ANOVA de duas vias, não houve efeito do estresse [ $F(1, 48) = 0,741$ ;  $P > 0,05$ ], nem da cirurgia [ $F(2, 48) = 0,862$   $P > 0,05$ ].  $N = 5-13$  animais/grupo.

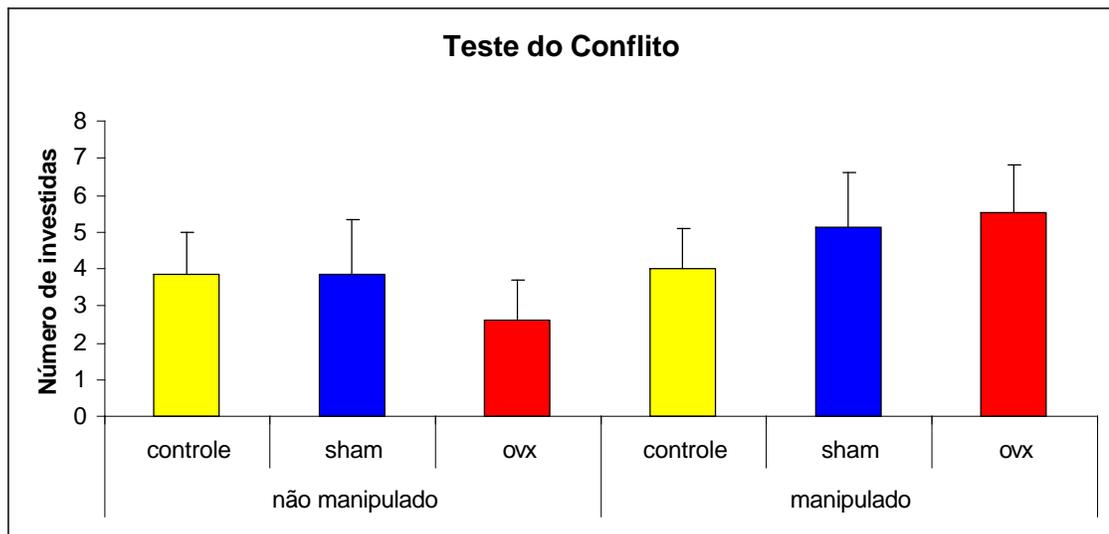


Figura 23: Número de investigadas. ANOVA de duas vias, não houve efeito do estresse [ $F(1, 48) = 1,789$ ;  $P > 0,05$ ], nem da cirurgia [ $F(2, 48) = 0,093$   $P > 0,05$ ].  $N = 5-13$  animais/grupo.

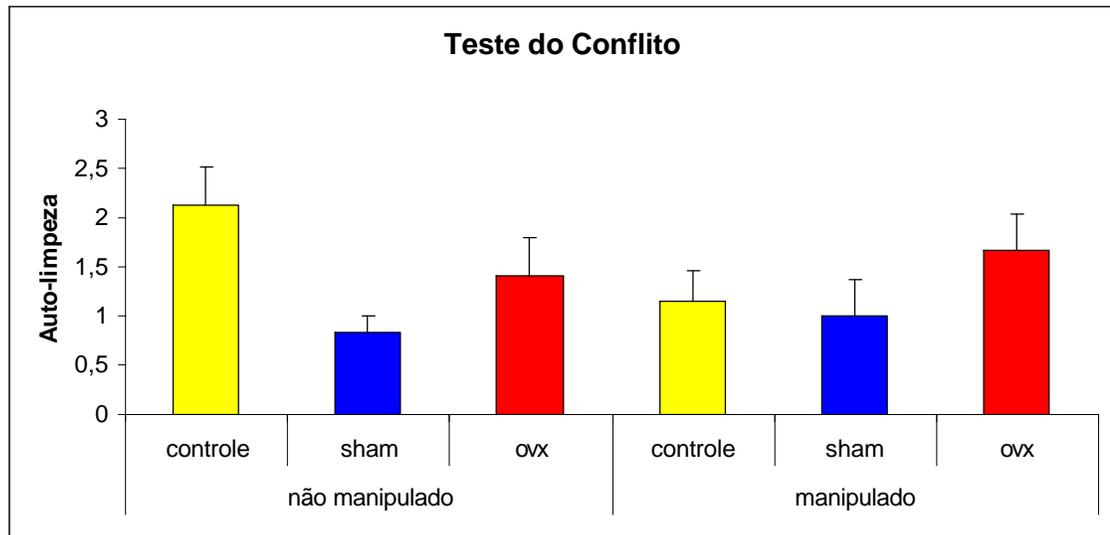


Figura 24: Freqüência de auto-limpeza (*grooming*). ANOVA de duas vias, não houve efeito do estresse [ $F(1, 48) = 0,331$ ;  $P > 0,05$ ], nem da cirurgia [ $F(2, 48) = 2,063$ ;  $P > 0,05$ ].  $N = 5-13$  animais/grupo.

## 6 DISCUSSÃO

Experiências precoces podem resultar em alteração da relação mãe-filhote. Em animais de experimentação, utiliza-se a intervenção no período neonatal, com manipulação dos animais ou separação da mãe por períodos diversos. A separação da mãe por períodos curtos, como esta utilizada no presente trabalho, leva a uma diminuição na resposta ao estresse na idade adulta, enquanto a separação por períodos mais longos leva a uma resposta exagerada ao estresse (LEVINE, 2005).

Animais separados de suas mães durante o período neonatal podem exibir profundas e duradouras alterações endócrinas e nas respostas comportamentais a estressores (FRANCIS *et al*, 1996; LEVINE, 1994; MEANEY *et al*, 1994). A duração dessa separação pode variar, separações breves são denominadas manipulação neonatal, nelas o filhote é separado 10 minutos por dia nos primeiros 10 dias de vida. Na separação neonatal o filhote é separado de sua mãe durante várias horas por dia nos primeiros dias de vida, esses dois tipos de separações podem levar a desfechos diferentes.

Animais manipulados no período neonatal apresentam reduzida responsividade do eixo HHA a estressores na vida adulta.(MEANEY *et al*, 1989). Dados da literatura mostram que animais manipulados exibem menos ansiedade no labirinto em cruz elevado (McINTOSH; ANISMAN; MERALI, 1998), defecam menos e exploram mais quando expostos a um ambiente novo (LEVINE *et al*, 1967; MEERLO *et al*, 1999).

Nesse estudo analisamos o comportamento do tipo ansioso do animal através de três testes comportamentais, a exposição ao Labirinto em Cruz Elevado (SILVEIRA *et al.*, 2005), o tempo despendido pelos animais nos quadrados centrais de um Campo Aberto (SILVEIRA *et al.*, 2005) e a motivação de o animal ir ao encontro da recompensa no Teste do Conflito (DUCOTTET; BELZUNG, 2004). Esses testes baseiam-se na sugestão de que, quanto maior a ansiedade, mais o animal procura por lugares onde se sinta protegido, evitando situações de risco, onde estaria mais exposto a um predador, por exemplo.

No teste do Labirinto em Cruz Elevado não encontramos diferenças entre os grupos manipulados e não manipulados, como era esperado. Conforme observado na figura 8, os animais não-manipulados produzem mais bolos fecais. Sugerimos que esses animais apresentam um maior número de bolos fecais porque esse é o primeiro aparato a que eles foram expostos. A hipótese é que seria uma reação ao ambiente novo. Os números de bolos

fecais analisados isoladamente são considerados uma medida de reatividade emocional, mas não é um indicativo claro de ansiedade.

Em nossos resultados, em relação à tarefa do Campo Aberto, encontramos que os animais manipulados apresentaram mais respostas de orientação (figura 13). Também observamos que os animais manipulados apresentaram um maior número de cruzamentos (figura 14). Ambos os grupos apresentaram memória da exposição ao Campo Aberto. Os animais manipulados apresentaram mais cruzamentos e *rearings* do que os não manipulados, ou seja, aumento da atividade locomotora. Isso está de acordo com dados da literatura, mostrando que animais manipulados apresentam menos medo a ambientes novos, aumento da atividade locomotora (LEVINE, 1993; MEANEY *et al.*, 1993). Não houve, porém, qualquer efeito da cirurgia, mostrando que hormônios gonadais não influenciam o desenvolvimento desse tipo de resposta nos animais manipulados.

Outro resultado observado foi a memória de exposição ao aparato, ou seja, o animal reconheceu o aparato no segundo dia de exposição, diminuindo assim o comportamento exploratório e a atividade locomotora do mesmo, algo que era esperado para ambos os grupos (manipulados e não-manipulados). Esse teste foi realizado em dois dias, sendo que no primeiro dia foi realizada a análise do comportamento do tipo ansioso do animal, visto que essa foi a primeira vez a qual o animal é exposto a esse aparato. E o segundo dia avalia a habituação do animal ao aparato, ou seja, avalia se houve memória de exposição ao aparato.

Observou-se no teste do Campo Aberto (figura 15) que os animais não manipulados apresentaram um maior tempo de auto-limpeza (*grooming*) do que os manipulados, não havendo memória de exposição ao aparato. O comportamento de auto-limpeza (*grooming*) pode aumentar quando o animal apresenta-se tranqüilo, ou em casos de ansiedade (de modo que apresenta uma curva em U invertido com relação ao grau de ansiedade). Assim, não pode ser utilizado isoladamente como indicativo de ansiedade.

O Teste do Conflito foi outra tarefa realizada. Esse teste avalia o enfrentamento do animal diante de uma situação aversiva e a motivação que ele teria para ultrapassar os obstáculos e ir ao encontro da recompensa. Nós não encontramos diferenças significativas entre os grupos em qualquer dos parâmetros avaliados. Estes resultados sugerem que a manipulação e a liberação de hormônios gonadais não interferem significativamente no comportamento de ratas nesta tarefa. O que seria esperado é que os animais manipulados apresentassem menos medo diante a um ambiente novo, no entanto não houve diferença entre os grupos. Nossos animais não estavam em restrição alimentar quando foi realizada esta

tarefa, é possível que o fato de os animais não estarem em jejum tenha diminuído a motivação para a busca da recompensa.

Esse teste foi realizado inicialmente por Ducottet e Belzung (2004) em camundongos que foram submetidos a estresse crônico variado, e ainda não existe ampla bibliografia utilizando ratos.

Em nossa busca bibliográfica, observamos que, em muitos estudos relacionados à manipulação neonatal e comportamento do tipo ansioso, foram utilizados principalmente machos. Supomos que isso é devido ao fato de que nos machos não há a variação do ciclo estral como nas fêmeas, e isso seria mais uma variável que influenciaria na modulação da ansiedade. Em nosso trabalho nós fizemos esse controle por meio da ovariectomia e não encontramos efeitos da liberação de hormônios gonadais, encontramos apenas diferenças em relação a manipulação neonatal.

O conceito de diferenciação cerebral do sistema nervoso pode se distinguir em uma fase organizacional e de uma fase ativacional dos esteróides sexuais: a primeira é o período crítico durante o qual os circuitos neurais específicos de cada sexo são determinados (começa no período embrionário e termina no período neonatal), e a segunda é quando, no adulto, esses hormônios são necessários para ativar aqueles circuitos (PILGRIM; REISERT, 1992).

Não houve efeito da ovariectomia entre os grupos. A ausência de estradiol antes da puberdade pode ter gerado uma adaptação no organismo do animal. Os animais em estudo foram submetidos à ovariectomia no período pré-pubere, ou seja, não sendo expostos aos efeitos ativacionais dos hormônios gonadais que ocorrem durante a puberdade, como eles não tiveram contato com esses hormônios nesse período, sua ausência pode não ter feito falta para o seu desenvolvimento.

Em ratos, a privação materna durante os 10 primeiros dias do período neonatal tem mostrado sérias consequências para os filhotes na vida adulta, incluindo o aumento do comportamento do tipo ansioso e reforço das respostas neuroendócrinas ao estresse, particularmente entre a prole masculina. Essas mudanças comportamentais e neuroendócrinas persistem através da vida, associadas a mudanças epigenéticas, indicando que a presença materna durante o período neonatal tem significantes efeitos no desenvolvimento das redes neurais (KIKUSUI; MORI, 2009)

Os comportamentos de lambar, de limpeza dos filhotes, e a amamentação em dorso arqueado são comportamentos relacionados ao cuidado materno. Em ratos, variações no comportamento materno, particularmente do comportamento de lambar/limpar, regulam o

desenvolvimento das respostas endócrinas, emocional e cognitiva ao estresse (CHAMPAGNE *et al.*, 2003). Além do mais, essas variações no cuidado materno tem sido associado com efeitos no desenvolvimento do sistema neural que mediam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e respostas ao estresse assim como certas formas de aprendizado e memória (CHAMPAGNE *et al.*, 2003).

Em um estudo realizado por Caldji *et al.* (1998) a ninhada adulta de mães alto grau de cuidado materno mostrou significativa redução do comportamento de medo em comparação a ninhada de mães baixo grau de comportamento materno. Outro estudo relacionado ao comportamento materno mostrou que a ninhada de mães que exibiram mais lambidas e cuidados de limpeza em seus filhotes, durante os primeiros 10 dias de vida, mostraram redução plasmática de hormônio adrenocorticotrófico e corticosterona em resposta ao estresse agudo (LIU *et al.*, 1997). Os achados sugerem que o cuidado materno tem o efeito protetor à ansiedade e medo na ninhada adulta, além de causar alterações na liberação de hormônios da adrenal.

Estudos têm mostrado que as ratas apresentam diferentes graus de cuidados com seus filhotes em função do sexo dos mesmos: por exemplo, mães com ninhadas contendo apenas machos apresentam maiores índices de cuidados maternos, como manutenção do ninho, lambidas, etc (ALLEVA *et al.*, 1989). Esses dados sugerem que filhotes machos e fêmeas estão expostos desde o período neonatal a diferentes padrões de comportamento materno. Podemos especular que os resultados encontrados nesse trabalho poderiam ter sido influenciados pelas diferenças de cuidados dispensados aos diferentes sexos da ninhada, porém como só trabalhamos com fêmeas, não podemos chegar a uma conclusão definitiva.

Diante de tudo o que foi exposto neste estudo, podemos nos perguntar se a manipulação neonatal tem realmente um efeito protetor? Visto que animais submetidos à manipulação neonatal têm um maior cuidado materno, apresentam menos medo e conseqüentemente menos comportamento do tipo ansioso. Será que não ter medo e ansiedade é algo bom? A ansiedade e o medo são mecanismos adaptativos que visam proteger-nos contra eventuais danos. A ansiedade só se torna um problema quando ela passa de algo adaptativo para patológico (CASTILLO *et al.*, 2000). Indivíduos que não tem medo poderiam se expor à situações perigosas, colocando em risco suas vidas. Portanto o medo e a ansiedade, em proporções adequadas, visam a perpetuação da espécie.

## 7 CONCLUSÕES

No Labirinto em Cruz Elevado houve um efeito do estresse, mostrando que os animais não-manipulados produzem mais bolos fecais. Não foram encontradas diferenças nos demais parâmetros analisados.

No Campo Aberto, os animais manipulados apresentaram mais respostas de orientação e um maior número de cruzamentos. Ambos os grupos apresentaram memória da exposição no Campo Aberto, tanto em relação as respostas de orientação quanto ao número de cruzamentos. Houve efeito do estresse sobre o comportamento de auto-limpeza, animais não manipulados apresentaram um maior tempo de auto-limpeza do que os manipulados.

No Teste do Conflito não encontramos diferenças significativas entre os grupos em qualquer dos parâmetros avaliados.

Concluimos que os efeitos da manipulação no período neonatal em ratos não foram afetados pela ausência, desde o período pré-pubere, de hormônios ovarianos. Assim, a liberação desses hormônios durante o desenvolvimento não é necessária para a instalação dos efeitos da manipulação que se manifestam na idade adulta.

Como perspectivas para futuros trabalhos na área, sugerimos a realização da dosagem de corticosterona, de estradiol e o controle do ciclo estral.

## REFERÊNCIAS

- ALLEVA, E.; CAPRIOLI, A.; LAVIOLA, G. Litter gender composition affects maternal behavior of the primiparous mouse dam (*Mus musculus*). **Journal of Comparative Psychology**, v.103 (1), p. 83-87, 1989.
- BARRERA, G.; ECHEVARRIA, D. J.; POULIN, J. F.; LAFOREST, S.; DROLET, G.; MORILAK, D. A. One for all or one for one: does co-transmission unify the concept of a brain galanin "system" or clarify any consistent role in anxiety? **Neuropeptides**, v.39 (6), p. 287-290, 2005.
- BODO, C; RISSMAN, E.F. New roles for estrogen receptor beta in behavior and neuroendocrinology. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 27(2), p. 217-32, 2006.
- BRANCHI, I; ALLEVA, E. Communal nesting, an early social enrichment, increases the adult anxiety-like response and shapes the role of social context in modulating the emotional behavior. **Behavioural Brain Research**, v.172 (2), p.299–306, 2006.
- CALDJI, C.; TANNEENBAUM, B.; SHARMA, S.; FRANCIS, D.; PLOTSKY, P.M. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proceedings of the national academy of sciences of The United States Of America**, v. 95(9), p. 5335-5340, 1998.
- CASTILLO, A.R.G.L.; RECONDO, R.; ASBAHR, F.; MANFRO, G.G. Transtornos de ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22(2), p.20-3, 2000.
- 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 & Behavior**, v. 79(3), p. 359-371, 2003.
- CHAVES, G.; MORETTI, M.; CASTRO, A.A.; DAGOSTIN, W.; SILVA,G.G.; BOECK, C.R.; *et al.* Effects of long-term ovariectomy on anxiety and behavioral despair in rats. **Physiology & Behavior**, v. 97 (3-4), p. 420-425, 2009.
- CIRULLI, F; BERRY, A; ALLEVA, E. Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27 (1-2), p. 73–82, 2003.
- CUSHING, B.S; KRAMER, K.M. Mechanisms underlying epigenetic effects of early social experience: the role of neuropeptides and steroids. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29 (7), p. 1089–1105, 2005.
- DUARTE, D.; HÜBNER, M.M.C. Ansiedade, bruxismo e aprendizagem: uma análise comparativa em alunos da 7ª série do ensino fundamental. **Psicologia: Teoria e Prática**, v.1(2), p.43-52, 1999.
- DUCOTTET, C.; BELZUNG, C. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. **Physiology & Behavior**, v.81 (3), p.417– 426, 2004.

DURAND, M.; SARRIEAU, A.; AGUERRE, S.; MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. Differential effects of neonatal handling on anxiety, corticosterone response to stress, and hippocampal glucocorticoid and serotonin (5-HT)<sub>2A</sub> receptors in Lewis rats. **Psychoneuroendocrinology**, v.23 (4), p.323–335, 1998.

FRANCIS, D., DIORIO, J., LAPLANTE, P., WEAVER, S., SECKL, J.R., MEANEY, M.J. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. Moms, pups, stress, and glucocorticoid receptors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 794, p. 136-152, 1996.

FRYE, C.A.; PETRALIA, S.M.; RHODES, M.E. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67(3), p. 587-596, 2000.

FRYE, C.A.; WALF, A.A. Changes in Progesterone Metabolites in the Hippocampus Can Modulate Open Field and Forced Swim Test Behavior of Proestrous Rats. **Hormones and Behavior**, v. 41(3), p. 306–315, 2002.

GOLDIM, J. R.; RAYMUNDO, M. M. **Pesquisa em saúde e direitos dos animais**. 2.ed. Porto Alegre: Hospital de Clínicas/Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, 1997. 30p.

GONZALEZ, A.S.; RODRIGUEZ ECHANDIA, E.L.; CABRERA, R.; FOSCOLO, M.R.; FRACCHIA, L.N. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult-rats. 1. Effects on forced swim behavior and endocrine responses. **Physiology & Behavior**, v. 47 (4), p. 735-741, 1990.

HARLOW, H.F. The nature of love. **American psychologist**, v.13 (12), p.673-685, 1958.

HERZOG, D.B.; STALEY, J.E.; CARMODY, S.; ROBBINS, W.M.; VAN DER KOLK, B.A. Childhood sexual abuse in anorexia nervosa and bulimia nervosa: a pilot study, **Journal Of The American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 32 (5), p. 962-966, 1993.

HINDE, R.A.; SPENCER-BOOTH, Y. Effects of brief separation from mother on rhesus monkeys, **Science**, v. 173 (3992), p. 111-118, 1971.

JAIME, A, P. G.; ANBINDER, A.L.; LIMA, A.P.; PRADO, F.A.; BALDUCCI, I.; ROCHA, R.F. Influência da administração local de alendronato sódico no reparo ósseo em calvária de ratas ovariectomizadas. **Ciência Odontológica Brasileira**, v.8 (2), p.70-79, 2005.

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**, v.73 (1), p.131-140, 2002.

KIKUSUI, T.; MORI, Y. Behavioural and Neurochemical Consequences of Early Weaning in Rodents. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21(4), p.427-431, 2009.

KLOET, E.R.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M.S.; JOELS, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocrine Reviews**, v.19 (3), p. 269-301, 1998.

LANDÉN, M; ERIKSSON, E. How does premenstrual dysphoric disorder relate to depression and anxiety disorders? **Depression and Anxiety**, v. 17 (3), p.122–129, 2003.

LEVINE S. Infantile experience and resistance to physiological stress, **Science**, v. 126 (3270), p. 405-405, 1957.

LEVINE, S. Plasma-free corticosteroid response to electric shocks in rats stimulated in infancy, **Science**, v.135 (3506), p.795–796, 1962.

LEVINE, S.; HALTMEYER, C.G.; KARAS, G. G.; DENEMBERG, V.H. Physiological and behavioral effect of infantile stimulation. **Physiology and Behavior**, v: 2, p. 55-59, 1967.

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

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

LEVINE, S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. **Psychoneuroendocrinology**, v.30 (10), p.939-946, 2005.

LIU, D.; DIORIO, J.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.; FREEDMAN, A.; *et al.* Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v. 277 (5332), p.1659-1662, 1997.

LLANEZA, D. C.; FRYE, C. A. Progestogens and estrogen influence impulsive burying and avoidant behavior of naturally cycling and ovariectomized rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 93 (3), p. 337-342, 2009.

LOVICK, T. A. Plasticity of GABAA receptor subunit expression during the oestrous cycle of the rat: implications for premenstrual syndrome in women. **Experimental Physiology**, v. 91(4), p. 655-60, 2006.

LUPIEN, S.J; McEWEN, B.S; GUNNAR, M.R.; HEIM, C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nature**, v. 10 (6), 434 – 445, 2009.

MACRI, S; MASON, G.J; WURBEL, H. Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. **European Journal of Neuroscience**, v.20 (4), p. 1017-1024, 2004.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62(4), p. 55-68, 2002.

MARGIS, R.; ZANATTO, V. C.; TRAMONTINA, F.; VINADE, E.; LHULLIER, F.; PORTELA, L. V.; SOUZA, D O.; *et al.* Changes in S100B cerebrospinal fluid levels of rats subjected to predator stress. **Brain Research Reviews**, v.1028 (2), p. 213-218, 2004.

McINTOSH, J.; ANISMAN, H.; MERALI, Z. Short- and long periods neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. **Developmental Brain Research**, v. 113 (1-2), p. 97-106, 1998.

MEANEY, M.J.; AITKEN, D.H.; BODNOFF, S.R.; INY, L.J.; SAPOLSKY, R.M. The effects of postnatal handling on the development of the glucocorticoid receptor systems and stress recovery in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 9(5-6), p. 731-734, 1985a.

MEANEY, M. J., AITKEN, D. H., BODNOFF, S. R., INY, L. J., TATAREWICZ, J. E.; SAPOLSKY, R. M. Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain-regions. **Behavioral Neuroscience**, v. 99 (4), p.765-770, 1985b.

MEANEY, M. J.; BHATNAGAR, S.; VAN BERKEL, C.; SAPOLSKY, R. M. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. **Science**, v. 239 (4841), p. 766-768, 1988.

MEANEY, M.J.; AITKEN, D.H.; VIAU, V.; SHARMA, S.; SARRIEAU, A. Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 50(5), p. 597-604, 1989.

MEANEY, M.J.; BHATNAGAR, S.; LAROCQUE, S.; MCCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; *et al.* Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 697, p. 70-85, 1993.

MEANEY, M.J.; DIORIO, J.; FRANCIS, D.; LAROCQUE, S.; O'DONNELL, D.; SMYTHE, J.W.; *et al.* Environmental regulation of the development of glucocorticoid receptor systems in the rat forebrain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.746, p. 260-274, 1994.

MEANEY, M.J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p.1161-1192, 2001.

MEDEIROS, J.P.; ESTEVÃO, L.R.M.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SANTOS, J.M.; SIMÕES, R.S.; SIMÕES, M.J.; *et al.* Efeito da ivermectina sobre a ciclicidade, gestação e desenvolvimento neonatal em ratos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal**, v.45 (6), p. 472-480, 2008.

MEEKER, M.; ROTHROCK, J.A.. Cuidados de enfermagem ao paciente cirúrgico. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 404p.

MEERLO, P; HORVATH, K.M.; NAGY, G.M.; BOHUS, B.; KOOLHAAS, J.M. A influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioral stress reactivity. **Journal of Neuroendocrinology**, v: 11, p. 925-933, 1999.

MUTH, J.E. Overview of biostatistics used in clinical research. **American Journal Of Health-System Pharmacy**, v. 66(1), p.70-81, 2009.

NELSON, R.J. **An introduction to Behavioural Endocrinology**. 3.ed, 2005.

- NOSCHANG, C.G.; PETTENUZZO, L.F.; VON POZZER TOIGO, E.; ANDREAZZA, A.C.; KROLOW, R.; FACHIN, A.; *et al.* Sex-specific differences on caffeine consumption and chronic stress-induced anxiety-like behavior and DNA breaks in the hippocampus. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, v. 94(1), p.63-71, 2009a.
- NOSCHANG, C.G.; KROLOW, R.; PETTENUZZO, L.F.; AVILA, M.C.; FACHIN, A.; ARCEGO, D.; *et al.* Interactions between chronic stress and chronic consumption of caffeine on the enzymatic antioxidant system. **Neurochemical Research**, v. 34(9), p.1568-74, 2009b.
- O'DONNELL, D.; LAROCQUE, S.; SECKL, J.R; MEANEY, M.J. Postnatal handling alters glucocorticoid, but not mineralocorticoid messenger-RNA expression in the hippocampus of adult-rats. **Molecular Brain Research**, v. 26 (1-2), p. 242–248, 1994.
- OVERHOLSER, B.R.; SOWINSKI, K.M. Biostatistics Primer: part I. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 22(6), p. 629-635, 2007.
- PAOLETTI, A.M.; FLORIS, S.; MANNIAS, M.; ORRÙ, M.; CIPPRA, D.; ORLAND, R.; *et al.* Evidence that cyproterone acetate improves psychological symptoms and enhances the activity of the dopaminergic system in postmenopause. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86(2), p.608-612, 2001.
- PILGRIM, C.; REISERT, I. Differences between male and female brains. Developmental mechanisms and implications. **Hormones and Metabolism Research**, v. 24 (8), p. 353-359, 1992.
- POLIT, D.F; BECK, C.T; HUNGLER, B.P. **Fundamentos de pesquisa em Enfermagem: métodos, avaliação e utilização**. 5 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 167-168p.
- RORTY, M.; YAGER, J. Histories of childhood trauma and complex posttraumatic sequelae in women with eating disorders. **Psychiatric Clinics of North América**, v. 19 (4), p. 773–791, 1996.
- SAPOLSKY, R.M.; MEANEY, M.J. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hypo-responsive period. **Brain Research Reviews**, v. 11(1), p. 65-76, 1986.
- SARRIEAU, A.; SHARMA, S.; MEANEY, M.J. Postnatal development and environmental-regulation of hippocampal glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. **Developmental Brain Research**, v. 43 (1), p.158–162, 1988.
- SCHANBERG, S.M.; KUHN, C.M. The Biochemical effects of tactile deprivation in neonatal rats. **Perspectives on Behavioral Medicine**, v.2, p.133-148, 1985.
- SILVEIRA, P.P; PORTELLA, A.K; CLEMENTE, Z; GAMARO, G.D; DALMAZ, C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23 (1), p. 93–99, 2005.
- SOMERA-MOLINA, K.C.; NAIR, S.; VAN ELDIK, L.J.; WATTERSON, D.M.; WAINWRIGHT, M.S. Enhanced microglial activation and proinflammatory cytokine up regulation are linked to increased susceptibility to seizures and neurologic injury in a ‘two-hit’ seizure model. **Brain Research**, v.1282, p. 162-72, jul, 2009.

WALF, A.A.; FRYE, C.A. ERb-Selective estrogen receptor modulators produce antianxiety behavior when administered systemically to ovariectomized rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 30 (9), p.1598–1609, 2005.

WEAVER, I.C; MEANEY, M.J; SZYF, M. Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United**, v. 103 (9), p. 3480-3485, 2006.

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

YOSHIMURA, S.; SAKAMOTO, S.; KUDO, H.; SASSA, S.; KUMAI, A.; OKAMOTO, R. Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. **Steroids**, v. 68 (5), p. 439-445, 2003.

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

ZIEGLER, D. R.; GAMARO, G. D.; ARAÚJO, E.; BASSANI, M. G.; PERRY, M.L.; DALMAZ, C.; *et al.* Nociception and locomotor activity are increased in ketogenic diet fed rats. **Physiology & Behavior**, v. 84 (3), p. 421-427, 2005.



**U F R G S**

UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética Na Utilização De Animais



**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética Na Utilização De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 18398

**Título:** INFLUÊNCIA DE HORMÔNIOS GONADAIS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE MUDANÇAS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS NA IDADE ADULTA EM ANIMAIS MANIPULADOS NO PERÍODO NEONATAL

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

CARLA DALMAZ - coordenador desde 01/03/2010  
 LUISA AMALIA DIEHL - Aluno de Doutorado desde 01/03/2010  
 ANA PAULA SOARES HUFFELL - Aluno de Graduação desde 01/03/2010  
 DANUSA MAR ARCEGO - Aluno de Graduação desde 01/03/2010  
 DANIELA PEREIRA LAUREANO - Aluno de Graduação desde 01/03/2010  
 Cristie Graziottin Noschang - Aluno de Doutorado desde 01/03/2010  
 Rachel Krolow Santos Silva - Aluno de Doutorado desde 01/03/2010

**Equipe Externa:**

Iuiza dalmaz fitarelli - Aluno de Graduação desde 01/03/2010

**Comissão De Ética Na Utilização De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.**

Porto Alegre, Sexta-Feira, 12 de Novembro de 2010

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO  
Coordenador da comissão de ética



COMISSÃO DE PESQUISA DA ESCOLA DE ENFERMAGEM DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

### CARTA DE APROVAÇÃO

**Projeto Docente:** 003/2010

**Versão Mês:** 07/2010

**Pesquisadores:** Profa. Elizeth Heldt e Daniela Pereira Laureano

**Título:** AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA MANIPULAÇÃO NEONATAL NO  
COMPORTAMENTO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS.

A Comissão de Pesquisa da Escola de Enfermagem da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (COMPESQ), no uso de suas atribuições, avaliou e aprova este projeto em seus aspectos éticos e metodológicos. Os membros desta Comissão não participaram do processo de avaliação de projeto onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração deverá ser comunicadas à Comissão.

Porto Alegre, 16 de julho de 2010.

  
Prof.ª Dra Eliane Pinheiro de Moraes  
Coordenadora da COMPESQ

  
Elizeth F. Waldman  
Coordenadora Substituta  
Compesq EEN - UFRGS