

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

MÁRCIA KRATZ

ESTUDO DA PERSISTÊNCIA DA EXTINÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS EM
ANIMAIS SUBMETIDOS A DIFERENTES INTERVENÇÕES NO PERÍODO
NEONATAL

Porto Alegre

2013

MÁRCIA KRATZ

ESTUDO DA PERSISTÊNCIA DA EXTINÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS EM
ANIMAIS SUBMETIDOS A DIFERENTES INTERVENÇÕES NO PERÍODO
NEONATAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Em Ciências Biológicas: Neurociência da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas: Neurociências.

Orientadora: Prof^a Dra. Carla Dalmaz
Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Quillfeldt

Porto Alegre
2013

Dedico este trabalho a minha querida amiga Josi Maria Zimmermann Peruzatto, pois sem sua persistência e apoio, jamais teria concluído esta etapa.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maroli e Rosa, por sempre compreenderem minhas escolhas e contribuírem para as minhas realizações. Por se preocuparem com meus horários e muitas vezes deixarem de viver suas vidas para se dedicarem a minha.

À minha orientadora, Dra Carla Dalmaz, pela confiança em me aceitar no seu laboratório, à oportunidade que abriu na minha vida acadêmica e por toda a paciência e acessibilidade que sempre demonstrou a qualquer questionamento que viesse a ter. Agradeço pela experiência, credibilidade, pelos conhecimentos adquiridos e principalmente por ter me aceitado da forma como eu sou.

Ao meu co-orientador, Dr. Jorge Quillfeldt pela atenção e por disponibilizar o pessoal do seu laboratório para me ajudar tanto na elaboração quanto na execução deste trabalho.

À minha amiga Josi Maria, por acreditar em mim mais do que eu mesma e a sua família, Marcelo e Murillo, por terem se tornado minha segunda família. Agradeço pela confiança, por terem me dado casa, comida e banho quente neste período e por todo apoio psicológico recebido no período pré e pós mestrado, em função das minhas perdas. O que vocês fizeram e fazem por mim é algo além de amizade.

Ao meu amigo Fernando por toda a alegria que trás a minha vida, tornando meus dias mais leves e confiantes.

Às minhas amigas Silvânia, Michele, Silulia e Cárin por fazerem parte ha tantos anos da minha vida, da minha história. Com vocês sei que nunca estarei sozinha.

Ao meu amigo querido Raphael por todas nossas sessões de “terapia”, sem as quais não teria evoluído.

Ao meu tio Mario, por todo apoio e recursos recebidos durante esse tempo e por sempre se preocupar e confiar em mim.

À minha querida amiga Daniela Laureano, pela parceria desde antes do mestrado, estudando e nos confundindo juntas. Agradeço pela companhia, pela ajuda nos experimentos e por ser a pessoa que sempre pude contar nos momentos de aperto.

À amiga Lindsey Cassini, recente, porém não menos importante, por toda ajuda durante a execução deste trabalho, por toda a confiança depositada em mim e principalmente por todo o carinho, preocupação e lealdade demonstrados. Nossos passeios e andanças ajudaram muito a aliviar a tensão nos momentos complicados.

Às colegas e amigas Rachel e Luisa por serem as primeiras a dividirem seus conhecimentos comigo no laboratório e por toda a paciência, força e ajuda que ofereceram antes de entrar no mestrado.

Aos colegas do laboratório 37 e demais colegas que sempre me ajudaram de alguma forma: Cristie, Camila, Marina, Ana Huffel, Ana Toniazzo, Carine, Carina, Grasi, Eduardo, Danusa, Josué, Ana Crestani, Rodrigo, Lucas, André, Tiago e Raphaela.

Aos funcionários do biotério do Departamento de Bioquímica, em especial à Taís.

A CAPES e CNPQ pela bolsa e apoio financeiro.

À Cibele Bonapace, por estar me ajudando a ver o mundo de outra forma.

*As convicções são inimigas da verdade bem mais
perigosas do que as mentiras.*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Experiências sensoriais no início da vida podem afetar o desenvolvimento neural e o comportamento de um animal adulto. Tanto a manipulação quanto a separação neonatal são utilizadas como modelo para avaliar de que forma mudanças no ambiente neonatal podem influenciar a vida adulta do animal. A manipulação neonatal em ratos consiste na separação dos filhotes por alguns minutos nas primeiras duas semanas de vida, os filhotes sendo afastados da mãe durante 10 minutos por dia, do 1º ao 10º dia e colocados em uma estufa a 32°C, enquanto a mãe permanece sozinha na caixa moradia, próxima a este equipamento. Na separação neonatal em ratos, os filhotes também são afastados das mães, do 1º ao 10º dia de vida, porém por um período mais longo (3 h/dia a 32°C). Sabe-se que tais procedimentos podem alterar a resposta ao estresse na vida adulta. O estresse mostra-se como um importante regulador dos processos de memória. O objetivo geral deste trabalho foi verificar se a manipulação e a separação materna no período neonatal alteram a persistência da extinção de uma memória aversiva, comparada com uma memória não-aversiva. Três meses após a realização das intervenções neonatais foram realizados os testes comportamentais para observação da memória dos animais, utilizando teste de medo condicionado ao contexto, como tarefa utilizando estímulo aversivo, e transferência social de preferência alimentar, como tarefa utilizando estímulo apetitivo. Conseguimos observar a partir das tarefas realizadas que o grupo controle demonstrou o comportamento esperado nos dois tipos de tarefa. Evidenciamos aprendizado significativo nas duas tarefas, eficiência na extinção, e recuperação espontânea da memória aversiva. Embora esta última etapa não tenha sido significativa na tarefa apetitiva, em média há um aumento visível no consumo no teste 2, mostrando de certa forma uma recuperação espontânea. O grupo manipulado apresentou aprendizado nos dois tipos de tarefa, e extinção satisfatória. Tanto na tarefa aversiva como na apetitiva, não houve recuperação espontânea da memória neste grupo. O grupo separado também demonstrou aprendizado nas duas tarefas, sendo que na tarefa aversiva se comportou de forma semelhante ao grupo controle, aprendendo a tarefa, extinguindo com eficiência e apresentando recuperação espontânea. Já na tarefa apetitiva o mesmo demonstrou deficiência no processo de extinção. Animais manipulados e separados apresentam comportamentos diferenciados tanto na tarefa apetitiva quanto na tarefa aversiva quanto à persistência dessas memórias, sendo que a memória mais robusta foi observada na tarefa apetitiva do grupo separado, dentro dos parâmetros aqui estudados.

Palavras-chave: Estresse. Memória. Manipulação neonatal. Separação neonatal. Estímulo aversivo

ABSTRACT

Sensory experiences early in life can affect neural development and behavior of an adult animal. Both, neonatal handling and separation are used as a model to assess how changes in the neonatal environment can influence adult life of the animal. Neonatal handling in rats is the separation of the pups for a few minutes in the first two weeks of life, where the pups are removed from the mother for 10 minutes per day, from day 1 to day 10, being placed in an oven at 32 ° C while the mother remains alone in the box next to housing this equipment. In neonatal separation in rats, the pups are also away from mothers, from day 1 to day 10, but for a longer period (3 h/day at 32 ° C). It is known that such procedures may alter the stress response in adulthood. The aim of this study was to check whether the handling and maternal separation in the neonatal period alters the persistence of extinction of an aversive compared with a non-aversive memory. Three months after the neonatal intervention, behavioral tests were performed to observe the memory in rats, using the task of contextual fear conditioning, as task using aversive stimulus, and social transmission of food preference, as task using appetitive stimulus. We observe from the tasks performed that the control group showed a similar and an expected behavior in both types of task. We evidenced significant learning on both tasks, efficient extinction, and spontaneous recovery of aversive memory. Although this last step was not significant in appetitive task, on average there is a noticeable increase in feed intake with cumin in test 2, indicating a spontaneous recovery. The manipulated group expressed learning in both tasks, and efficient extinction, as there was no spontaneous recovery in both, the aversive and the appetitive tasks. The separate group show learning in both tasks, whereas the aversive task behaved similarly to the control group, the learning tasks, extinguishing efficiently and presenting spontaneous recovery. Animals handling and separated have different behaviors in both appetitive task in the task as aversive as the persistence of these memories, and memory stronger was observed in the separate group in appetitive task within, the parameters studied here.

Keywords: Stress. Memory. Neonatal handling. Neonatal separation. Aversive stimulus

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Sistema de resposta ao estresse	14
Quadro 1 – Classificação da memória quanto à duração	20
Quadro 2 – Classificação da memória quanto à natureza do conteúdo	21
Figura 2 – Localização da Amígdala basolateral (BLA) no cérebro	24
Figura 3 – Aparato adaptado para Tarefa aversiva	31
Figura 4 – Esquema experimental da Tarefa aversiva – Medo condicionado ao contexto	32
Figura 5 – Caixa de Interação social separada por grade	34
Figura 6 – Interação social de Observadores e Demonstradores	35
Figura 7 – Esquema experimental da Tarefa apetitiva – Transmissão social da preferência alimentar	36
Figura 8 – Desenho experimental do estudo	37
Gráfico 1 - Desempenho geral dos grupos experimentais na tarefa Medo condicionado ao contexto.	40
Gráfico 2 - Desempenho dentro de cada grupo experimental na tarefa de Medo condicionado ao contexto.	41
Gráfico 3 - Média geral de freezing por grupo durante a extinção	42
Gráfico 4 - Consumo de ração padrão com cominho nos diferentes grupos durante o experimento.	44
Gráfico 5 - Consumo de ração padrão com cominho dentro dos grupos durante o experimento.	45
Gráfico 6 - Comparação com a preferência basal	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrópico
ADN – Ácido Desoxirribonucléico
AVP – Arginina-Vasopressina
CA1 – Corno de Amon 1, área hipocampal
CA3 – Corno de Amon 3, área hipocampal
CEUA – Comissão de Ética no uso de animais
CIOMS – *Council for International Organization of Medical Science*
CREAL - Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
CRH – Hormônio Liberador de Corticotropina
HPA – Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal ou Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
mA – miliampere
NAc – Núcleo Accumbens
NMDA – Receptor N-metil-D- aspartato
PVN – Núcleo Paraventricular Hipotalâmico
RM – Receptores Mineralocorticóides
RG – Receptores Glicocorticóides
VTA – Área Tegmentar Ventral
W – Watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Estresse	12
1.2 Manipulação e Separação materna no período neonatal	16
1.3 Memória e Estresse	19
1.4 Evocação, extinção e recuperação da memória	25
2 HIPÓTESE	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Animais experimentais	29
4.2 Grupos experimentais	29
4.3 Experimentos Comportamentais	30
4.3.1 Tarefa Aversiva – Medo condicionado ao contexto	31
4.3.2 Tarefa Apetitiva – Transmissão social da preferência alimentar	32
4.4 Desenho Experimental	37
4.5 Considerações Éticas	38
4.6 Análise Estatística	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Tarefa Aversiva – Medo condicionado ao contexto	39
5.2 Tarefa Apetitiva – Transferência social de preferência alimentar	43
6 DISCUSSÃO	48
6.1 Tarefa Aversiva – Medo condicionado ao contexto	48
6.2 Tarefa Apetitiva – Transferência social de preferência alimentar	50
6.3 Tarefa Aversiva x Tarefa Apetitiva	52
7 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Períodos críticos são fases específicas durante o desenvolvimento, quando processos dependentes da genética e de condições ambientais interagem para estabelecer características funcionais (CREWS & HODGE, 2007). Dessa forma, o desenvolvimento e a gravidade de diversas condições comportamentais ou patológicas na vida adulta dependem da vulnerabilidade genética do indivíduo, da exposição a fatores ambientais adversos, do período de ocorrência do insulto (CHARMANDARI *et al.*, 2003) e da sua frequência.

No momento do nascimento dos mamíferos, estes não estão com o sistema nervoso plenamente desenvolvido. Em função desta condição, neste momento o sistema nervoso se mostra sensível a alterações ambientais. O desenvolvimento de respostas adaptativas ao estresse pode ser modificado por eventos ocorridos neste período (MEANEY *et al.*, 1993).

Durante o período neonatal ocorrem adaptações do recém-nascido à vida extrauterina e este período é determinante para o sistema nervoso central e sobre seus aspectos cognitivos. Intervenções realizadas neste período podem causar modificações no seu desenvolvimento que poderão ser observadas quando adulto. Dessa forma, a privação da figura materna no período neonatal pode afetar definitivamente o comportamento deste indivíduo na vida adulta (MEERLO, *et al.*, 2000).

Um ambiente neonatal adequado tem se mostrado cada vez mais importante para um desenvolvimento saudável do indivíduo, pois em função da vulnerabilidade encontrada no período neonatal, intervenções realizadas neste momento na relação da mãe com os filhotes podem afetar o desenvolvimento do sistema nervoso do filhote e modificar a resposta materna, já que a mãe pode assumir comportamentos que afetem seu relacionamento. Experiências negativas no início da vida podem perturbar respostas adaptativas normais durante a vida adulta (MEERLO, *et al.*, 1999). A plasticidade cerebral perinatal aumenta a vulnerabilidade a diversos tipos de experiências precoces, levando a um desenvolvimento e comportamento fora dos padrões tidos como normais (ANAND & SCALZO, 2000).

O período neonatal corresponde ao período onde as primeiras ligações sociais do animal são formadas (SCOTT, 1962), através do contato com os irmãos e

principalmente com a figura materna. Neste momento o animal é totalmente dependente dos cuidados da mãe, seja quanto à alimentação, calor ou qualquer outra forma de cuidado. A privação da figura materna neste momento pode tornar-se um insulto gravíssimo para o desenvolvimento deste recém-nascido, visto que sua principal fonte de proteção foi banida e a percepção do abandono é inevitável (KUHN, *et al.*, 1978; 1979; SCHAMBERG, *et al.*, 1984).

Embora uma série de investigações epidemiológicas tenham associado complicações peri e neonatais com um comportamento adulto modificado, o entendimento dos mecanismos subjacentes permanecem rudimentares (ANAND & SCALZO, 2000). A vulnerabilidade na vida adulta pode ter como seu maior contribuinte a qualidade do ambiente familiar durante o desenvolvimento, principalmente na infância (FRANCIS *et al.*, 1999). Vítimas de abusos físico ou sexuais têm maiores riscos de desenvolver algum tipo de doença mental quando adultos. Negligência emocional persistente ou condições adversas precoces levam a um aumento no risco de desenvolver depressão ou transtornos de ansiedade em um nível bem próximo ao observado em um indivíduo que foi abusado (FRANCIS *et al.*, 1999). Assim, estímulos ambientais durante o início da vida pode influenciar de forma permanente o desenvolvimento de um organismo, causando modificações robustas no comportamento e na fisiologia na idade adulta (MEERLO *et al.*, 1999).

1.1 Estresse

O entendimento para o termo estresse está baseado em experimentos de Hans Selye, datados do início do século 20. Pesquisando os efeitos de um extrato químico, observou o desenvolvimento de úlceras gastrointestinais, atrofia do sistema imunitário e aumento das glândulas adrenais em ratos. Contudo, não apenas os animais injetados com o extrato apresentaram estas injúrias: os ratos do grupo controle, que haviam recebido injeção de solução salina, apresentaram alterações semelhantes. Selye então concluiu que tais alterações estavam relacionadas à aplicação das repetidas injeções. Este obteve os mesmos resultados expondo animais ao frio, à patógenos, à toxinas ou ao barulho (SELYE, 1936; SAPOLSKY, 1990), sugerindo que as próprias condições estavam levando a estas mudanças.

Com base nestes resultados, Selye descreveu a Síndrome Geral da Adaptação, que representava uma reação geral e inespecífica do organismo a estímulos aversivos ou a situações desconhecidas, cuja finalidade seria a manutenção da homeostasia e adaptação do organismo à nova condição (SELEY, 1936). Após estes estudos propôs o termo *estresse* (apud TANNO & MARCONDES, 2002).

O estresse representa a resposta do organismo, enquanto que o seu agente causador é definido como estímulo estressante ou estressor (PICKERING, 1981).

O termo estresse refere-se ao estado gerado pela percepção de estímulos que provocam excitação emocional e, ao perturbarem a homeostasia, disparam um processo de adaptação, caracterizado por diversas manifestações sistêmicas, com distúrbios fisiológicos e psicológicos. O termo estressor por sua vez seria definido como um desafio ao indivíduo, que ao perturbar sua homeostase, gera uma resposta fisiológica. Pode também ser apenas uma interpretação errada de uma situação, tida como ameaçadora, que resultará numa resposta comportamental e/ou hormonal para adaptativa (McEWEN, 2002).

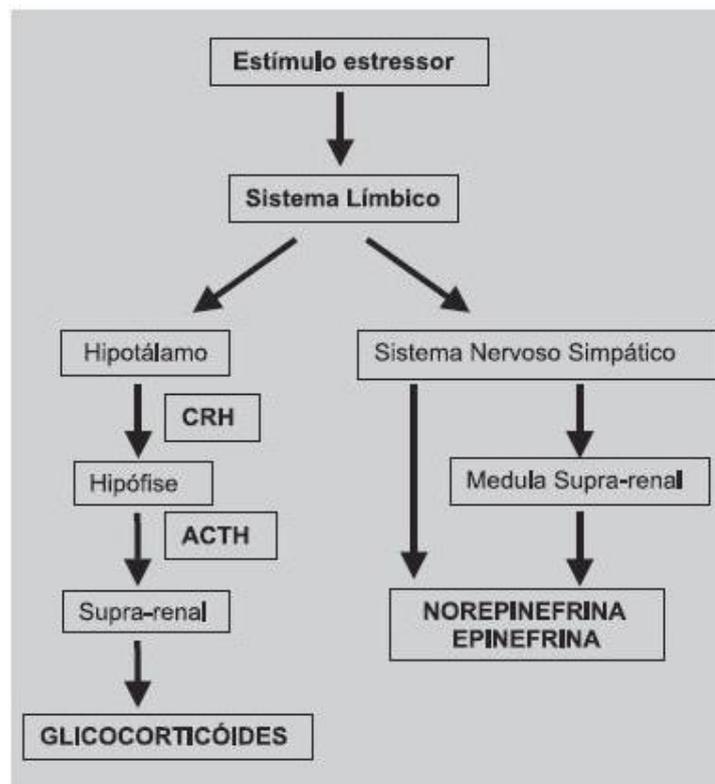
Esta resposta ao estressor compreende aspectos cognitivos, comportamentais e fisiológicos, visando propiciar uma melhor percepção da situação e de suas demandas, assim como um processamento mais rápido da informação disponível, possibilitando uma busca de soluções, selecionando condutas adequadas e preparando o organismo para agir de maneira rápida e vigorosa (LABRADOR & CRESPO, 1994).

O organismo responde de diversas formas ao estresse, com respostas neurovegetativas, imunológicas e através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Uma das principais respostas ao estresse ocorre pela ativação do eixo HPA. Este eixo compreende um sistema que contribui para a manutenção do balanço energético e é uma parte fundamental da resposta endócrina do organismo ao estresse. Ele é formado por três elementos arranjados de forma serial, conectados através da vascularização, onde a ativação de um elemento é dependente de outro, de forma sequencial, através de sinalização química.

Sinais neurais reconhecidos como estresse são levados para o hipotálamo, onde ocorre então a síntese e secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) e outros peptídeos como a vasopressina pelas células parvocelulares do núcleo paraventricular. Esses peptídeos são então passados do hipotálamo para a hipófise anterior, onde o CRH começa a estimular a síntese e liberação do hormônio

adrenocorticotrópico (ACTH) na circulação sistêmica. O ACTH presente na circulação sistêmica estimula então a liberação de corticoides pela glândula adrenal. O glicocorticoide no rato é a corticosterona, que produz lipólise, glicogenólise e o catabolismo de proteínas, mantendo altos os níveis de substratos energéticos na corrente sanguínea, suprimindo também a resposta imunológica do organismo (MEANEY *et al.*, 1993). Este sistema de resposta ao estresse é demonstrado de forma simplificada na Figura 1.

Figura 1 – Sistemas de resposta ao estresse



Fonte: Tanno e Marcondes, 2002.

O controle da liberação de glicocorticoides pela medula da adrenal é realizado a partir de uma retroalimentação negativa, através do qual este sistema é inibido (DALMANN, 2000). Os glicocorticoides regulam a liberação do ACTH, agindo também em outras regiões cerebrais para regular também a liberação de CRH. O hipotálamo, a hipófise e hipocampo estão envolvidos na retroalimentação negativa (FRANCIS *et al.*, 1996).

A atuação dos glicocorticoides no encéfalo de ratos ocorre através de dois tipos de receptores. Um destes receptores, os receptores mineralocorticoides (MR's), são sensíveis aos níveis basais de glicocorticoides e ocorrem em maior quantidade no hipocampo. Os outros receptores, os receptores glicocorticoides (GR's) são mais sensíveis a alterações da concentração de glicocorticoides como ocorre no estresse, agindo assim na retroalimentação negativa (SAPOLSKY, 2007).

A ativação aguda desses sistemas se mostra adaptativa, com aumento da disponibilidade de energia e do fluxo sanguíneo em órgãos-alvo (TSIGOS *et al.*, 2002). Assim, os glicocorticoides possuem efeitos diversos no organismo, como o aumento da disponibilidade de substrato energético em diferentes partes do corpo e a adaptação às modificações do ambiente (LUPIEN *et al.*, 2005). No entanto, a exposição crônica a altos níveis de glicocorticoides mostra-se prejudiciais ao organismo (DALMANN *et al.*, 2004; MILLER & O'CALLAGHAN., 2002).

O eixo HPA possui uma regulação suscetível no período pré e pós-natal imediato, apresentando alta plasticidade (FRANCIS, *et al.*, 1999). Diferenças nos níveis normais de secreção de glicocorticoides neste período podem alterar definitivamente a resposta do organismo ao estresse (LEVINE *et al.*, 1967).

No rato, durante as primeiras semanas de vida, o eixo HPA apresenta uma menor responsividade, a glândula adrenal é menos sensível ao hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), e as concentrações, tanto basais como induzidas por estresse, de corticosterona, ACTH e hormônios secretados pelo hipotálamo, mostram-se diminuídas. O processo ativo evidenciado e a imaturidade estrutural do sistema nervoso parecem ser subjacentes a essa hiporresponsividade geral (ROSENFELD *et al.*, 1992). A concentração plasmática destes hormônios cresce paulatinamente até a puberdade (WALKER *et al.*, 1986).

No caso de animais experimentais como os ratos, intervenções realizadas na infância influenciam a interação da mãe com os filhotes, pois a mãe pode desenvolver determinados comportamentos que afetam o desenvolvimento do sistema nervoso dos seus filhotes. Esse processo modula o desenvolvimento do eixo HPA e está associado a modificações futuras na vida destes animais (LEVINE *et al.*, 1967).

1.2 Manipulação e Separação materna no período neonatal

Experiências sensoriais no início da vida podem afetar o desenvolvimento neural e o comportamento de um animal adulto. Um exemplo dessas experiências são os estímulos estressantes do ambiente, que podem modificar o desenvolvimento neural (GONZALES *et al.*, 1990). A ocorrência de eventos precoces estressantes durante o período hiporresponsivo ao estresse podem influenciar tanto no comportamento emocional quanto na maturação do eixo HPA do rato (LUCION, 1997). Os efeitos das intervenções neonatais constituem a base da vulnerabilidade do indivíduo a doenças decorrentes do estresse (KAUFMAN *et al.*, 2000).

Levine (1957; 1959) evidenciou desde seus primeiros experimentos que a capacidade dos ratos para lidar com o estresse é modulada por experiências precoces. Assim, ratos separados diariamente de suas mães por breves períodos (3 minutos; manipulação neonatal) durante as primeiras três semanas de vida mostram uma redução de peso da glândula adrenal, 24 horas após uma injeção única de glicose (LEVINE, 2001). Denenberg *et al.* já haviam proposto que estes efeitos poderiam estar sendo mediados por alterações no comportamento maternal induzido pela própria manipulação neonatal (DENENBERG *et al.*, 1969). Porém, só há alguns anos tal hipótese foi confirmada experimentalmente (LIU *et al.*, 1997). A manipulação neonatal foi encontrada então como forma de estimulação do cuidado materno, e apresentou aumento espontâneo dos níveis de cuidado materno, que está associado com a redução comportamental e endócrina quanto à resposta ao estresse na vida adulta destes filhotes (FRANCIS *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 1997). Essas mudanças quanto à reatividade do eixo HPA parecem depender de alterações na metilação do ADN e na estrutura da cromatina, induzidas através das mudanças ambientais representadas pelo cuidado materno (WEAVER *et al.*, 2004). Ratos adultos que passaram pela manipulação precoce apresentam maior densidade de receptores para glicocorticoides no hipocampo e reagem ao estresse agudo de forma diferenciada, com pico de glicocorticoides semelhantes a animais não-manipulados, mas um retorno mais rápido dos hormônios aos níveis basais (MEANEY *et al.*, 1989).

Entretanto, longos períodos de separação materna (3 – 6 h) produzem resultados menos consistentes. Neste tipo de intervenção, alguns resultados

demonstram um aumento comportamental e endócrino de resposta ao estresse nesses indivíduos (BIAGINI *et al.*, 1998; McCORMICK *et al.*, 2002; PLOTSKY & MEANEY, 1993), e outros resultados demonstram não haver efeito significativo (CALDJI *et al.*, 2000; HILAKIVI-CLARKE, 1991; LIU *et al.*, 2000). Embora esses diversos resultados sejam contrastantes, a separação materna priva os filhotes do cuidado materno, induzindo um aumento nos níveis de resposta ao medo e ao estresse na prole adulta (MEANEY, 2001).

Dessa forma, a manipulação neonatal em ratos consiste no afastamento dos filhotes da mãe por alguns minutos (menos de 30 minutos) nas primeiras duas semanas de vida, enquanto a separação consiste da separação dos filhotes da mãe, permanecendo longe durante períodos mais longos (mais de 30 minutos normalmente de 3 a 6 horas, ou até 24 horas, sendo neste caso considerado Privação materna; LIU *et al.*, 1997). A manipulação faz com que na vida adulta o indivíduo apresente uma série de alterações comportamentais e endócrinas, incluindo uma diminuição do medo a novos ambientes. Estes animais também apresentam na vida adulta uma resposta menos acentuada da secreção de glicocorticoides pela adrenal quando expostos a estímulos estressores (LEVINE, 1993; MEANEY *et al.*, 1993). A separação ou privação materna – durante 3 horas ou mais – mostra efeito distinto, podendo então aumentar a ansiedade e a reatividade neuroendócrina frente a um estressor na idade adulta (KALINICHEV *et al.*, 2002; OGAWA *et al.*, 1994).

Em condições naturais, o desenvolvimento neural em um rato tipicamente ocorre em ambiente escuro e tranquilo, em que a maior fonte de estimulação provém da mãe e dos seus companheiros de ninho (CALDJI *et al.*, 1998). Dessa forma, qualquer modificação nesse ambiente pode interferir no seu desenvolvimento neural. Diversos estudos mostram que a manipulação neonatal ou qualquer outra intervenção do animal nesse período alteram o comportamento da mãe com seus filhotes, formando um conceito de que os efeitos dessas intervenções podem ser mediados pelas mudanças na interação mãe-filhote, afetando o desenvolvimento neural dos últimos. Podem ser observados na vida adulta, como efeito da manipulação neonatal, um aumento no consumo de alimento palatável doce e salgado (SILVEIRA *et al.*, 2004) e uma diminuição dos parâmetros relacionados à ansiedade (LEVINE *et al.*, 1967; SILVEIRA *et al.*, 2005). Porém, o aumento de consumo desse tipo de alimento não está relacionado com a ansiedade, pois

quando utilizado benzodiazepínico para tratamento, esta condição não se modifica (SILVEIRA *et al.*, 2005).

Já na separação materna, os filhotes ficam privados de diversos tipos de estímulos, como tátil, olfatório, térmico, nutricional e auditivo, fatores importantes para a regulação da sua fisiologia e de seu comportamento, levando aos efeitos comportamentais vistos na idade adulta (MARMENDAL, 2005; KUHN & SCHANBERG, 1998; HOFER, 1994). Os ratos que passaram por separação materna respondem mais intensamente a um estímulo estressor na vida adulta (PLOTSKY & MEANEY, 1992). Wigger e Neumann confirmam estes resultados, através de ratos adultos (4 a 5 meses) que sofreram separação materna de 3 horas por dia nas duas primeiras semanas de vida. Ao realizar o teste do Labirinto em cruz elevada, tanto os machos como as fêmeas mostraram menor atividade exploratória neste aparato quando comparado ao grupo controle, permanecendo menos tempo nos braços abertos do labirinto, resultado este interpretado como demonstrativo de maior comportamento ansioso no animal exposto ao teste. Quando adultos, os animais privados do contato maternal no período neonatal mostram aumento da expressão de comportamentos associados à ansiedade, como ficou evidenciado no teste do labirinto (WIGGER & NEUMANN, 1999). Em outro experimento (BIAGINI *et al.*, 1998), ratos separados 5 horas por dia do 2° ao 6° dia pós-parto apresentaram, na vida adulta, maior secreção de corticosterona após um teste de estresse por exposição à novidade. Estes mesmos ratos também apresentaram uma menor imunorreatividade para receptores de glicocorticoides ativados na área CA1 no hipocampo após exposição ao estresse. Desta forma, a separação no período neonatal pode diminuir a eficácia do controle adrenocortical do eixo HPA na vida adulta destes animais.

A privação materna nos primeiros dias de vida também prejudica o comportamento sexual do animal adulto. Ratos machos adultos separados da mãe por 6 horas diárias neste período apresentaram comportamento sexual reduzido, uma latência maior em montar na fêmea receptiva (RHESS *et al.*, 2001).

Estudos indicam que a separação no período neonatal faz com que o indivíduo adulto demonstre maior medo em um ambiente novo, como o campo aberto ou labirinto em cruz elevado (WIGGER & NEUMANN, 1999; OGAWA *et al.*, 1994), enquanto animais manipulados apresentam o comportamento oposto.

A sensibilidade às drogas psicoativas também aparece como um dos efeitos da separação neonatal. Em um estudo de 2002, Meaney *et al* observaram a atividade locomotora dos animais separados, usando o teste do campo aberto, após a administração de anfetamina. Os ratos separados apresentaram um aumento significativo na sua locomoção. Esta condição pode estar relacionada com o aumento de glicocorticoides circulantes que induz um aumento da liberação de dopamina no núcleo accumbens, já que secretam mais corticosterona em ambientes estressantes (MEANEY *et al.*, 2002).

Estes dados refletem a preocupação quanto à participação materna do desenvolvimento do indivíduo, visto que nenhuma das duas condições (maior ou menor reatividade ao estresse) se apresenta como ideal para a sobrevivência e permanência desse animal na natureza. É necessário que exista um equilíbrio fisiológico através da percepção correta dos fatores ambientais para que ocorra um desenvolvimento estável e apropriado, de forma a minimizar os riscos da ocorrência de patologias na idade adulta. Dessa forma percebemos a importância do cuidado materno adequado para o desenvolvimento saudável de um indivíduo.

1.3 Memória e estresse

Memória é a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações (IZQUIERDO, 1999). A aquisição da memória é representada pelo aprendizado; já a formação e a conservação são processos complexos e dependem do tipo de memória envolvida; e a evocação é o processo de lembrança do que foi aprendido (IZQUIERDO, 2002a; SQUIRE & KANDEL, 2003).

Conforme a importância da informação e o grau de emoção e atenção envolvidos no momento da aquisição de determinada memória, tanto a intensidade quanto a duração desta memória pode variar. A memória pode ser classificada conforme sua duração e quanto ao conteúdo da informação, conforme quadro I e II:

QUADRO I – CLASSIFICAÇÃO DA MEMÓRIA QUANTO A DURAÇÃO:

TIPO	DURAÇÃO	CARACTERÍSTICAS
Memória de Trabalho	De segundos à poucos minutos	Não produz “arquivos” duradouros. Mantém a informação através da atividade de neurônios do córtex pré-frontal enquanto estamos executando uma tarefa específica.
Curta duração	Até cerca de 6 horas após o aprendizado	Mantém a informação enquanto a memória de longa duração está sendo formada. Não requer síntese de novas proteínas.
Longa duração	Dias, anos ou toda a vida	Garante o registro do passado autobiográfico, conhecimento e habilidades do indivíduo.

Fonte: De Oliveira Alvares, L. Participação do sistema canabinóide endógeno hipocampal na consolidação, reconsolidação e extinção da memória de ratos. 2010. Autorizado pelo autor.

QUADRO II – CLASSIFICAÇÃO DA MEMÓRIA QUANTO A NATUREZA DO SEU CONTEÚDO:

Tipo	Características	Principais estruturas encefálicas envolvidas
Declarativa ou Explícita	Podem ser subdivididas em episódicas, quando referem-se a eventos autobiográficos, e semânticas, quando referem-se a fatos e conceitos.	Hipocampo, amígdala, diencéfalo e neocórtex.
Não-declarativa ou Implícita	Hábitos ou habilidades motoras.	Núcleos da base e cerebelo.

Fonte: De Oliveira Alvares, L. Participação do sistema canabinóide endógeno hipocampal na consolidação, reconsolidação e extinção da memória de ratos. 2010. Autorizado pelo autor.

As memórias são formadas a partir de mudanças da transmissão sináptica entre neurônios, que ocorrem como resultado da atividade neural prévia (SQUIRE & KANDEL, 2003), porém algumas dessas mudanças podem inibir a formação e evocação da memória, prejudicando esse processo (IZQUIERDO, 2002b).

É interessante ressaltar que as memórias são moduladas pelas emoções, pelo nível de alerta e pelo estado de ânimo do indivíduo, sendo difícil adquirir memórias sem um estado mínimo de alerta (IZQUIERDO, 2002b e 2004a). Dessa forma, o estresse mostra-se como um importante regulador dos processos de memória, possuindo ações diferentes na atuação aguda e crônica (SANDI, 2011). Sapolsky *et al.*, durante a década de 80, propuseram que os glicocorticoides, quando encontrados em altas concentrações e por um longo período, poderiam agir de maneira tóxica no sistema nervoso, provocando uma redução do volume hipocampal e/ou piorando lesões já existentes nesta área (SAPOLSKY *et al.*, 1985). Lupien *et al.* observaram uma redução de 14% no volume hipocampal de pacientes expostos a altas doses de glicocorticoides por períodos prolongados, porém, mesmo de forma aguda ou por um curto período, altas doses de glicocorticoides

podem também atuar de maneira neurotóxica (LUPIEN *et al.*, 2005). Magariños *et al.*, em um experimento realizado com roedores, demonstraram que existe uma correlação entre situações estressantes repetidas e atrofia nos neurônios piramidais CA3, localizados no hipocampo (MAGARIÑOS *et al.*, 1996). Gould *et al.* verificaram uma redução no número de novas células granulares produzidas no hipocampo três horas após a administração de glicocorticoides em macacos adultos; neste caso, porém, foi possível reverter estas alterações (GOULD *et al.*, 1998). Starkman *et al.* realizaram um estudo com 24 pacientes portadores da síndrome de Cushing, caracterizada pela produção excessiva de glicocorticoides no organismo. Quando os indivíduos tiveram as concentrações de glicocorticoides normalizadas em função de tratamentos prévios, observou-se um aumento no volume hipocampal destes pacientes, caracterizando uma recuperação da estrutura (STARKMAN *et al.*, 1992). Este fato sugere que déficits de memória, atenção e aprendizado, entre outros fatores, podem ser dependentes de um período de vida de maior exposição a estressores.

A formação da memória depende de uma longa sequência de eventos bioquímicos, os quais são susceptíveis a elementos estressores, às emoções, aos níveis de consciência e ao estado de ânimo do indivíduo (IZQUIERDO, 1999). A conservação ou o armazenamento da informação ocorre por meio de modificações permanentes ou muito duradouras da forma e função das sinapses das redes neurais de cada memória (IZQUIERDO 2002a). A evocação de uma informação ocorre por meio da reativação destas redes para cada conteúdo armazenado (IZQUIERDO & MEDINA, 1997a; IZQUIERDO & MEDINA, 1997b, BAUDRY, 1998).

A plasticidade dos circuitos do hipocampo, necessária para as funções de aprendizado e memória, pode aumentar a sua vulnerabilidade a diversos tipos de agressões impostas pelo ambiente, incluindo o estresse (AISA *et al.*, 2006). A exposição a níveis elevados de corticosterona durante o período neonatal (demonstrado em crias pelos níveis significativamente mais elevados de corticosterona comparando com animais controle durante o período de separação maternal) pode afetar o desenvolvimento do hipocampo (HUOT *et al.*, 2002).

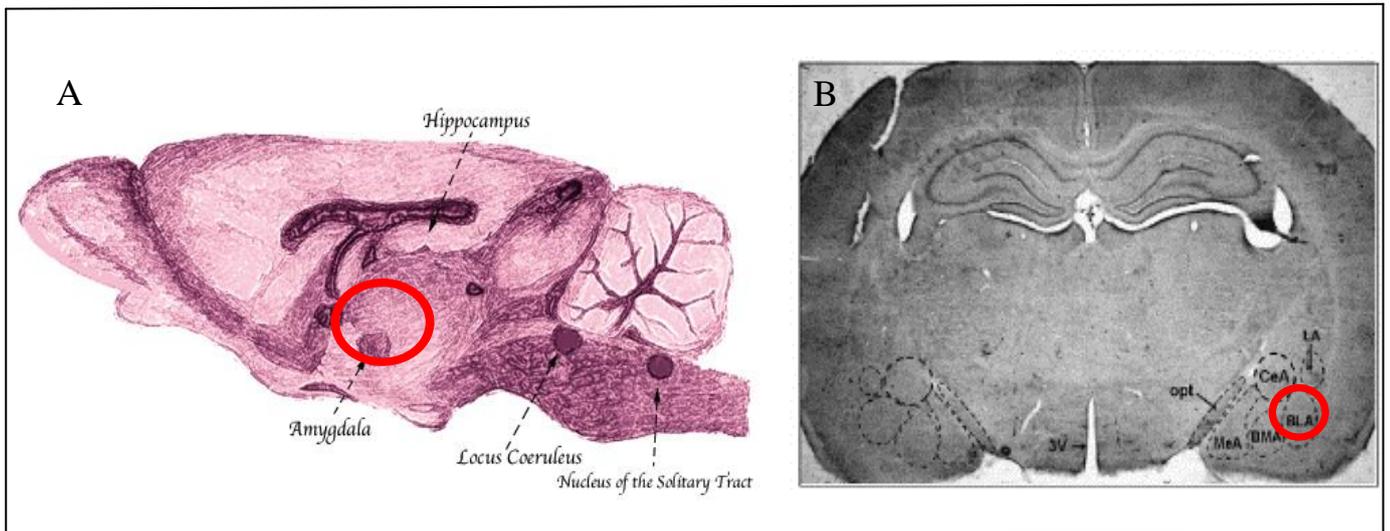
Os corticosteroides afetam as propriedades do hipocampo de forma lenta, porém persistente. A natureza destes efeitos, no entanto, irá depender da participação relativa de receptores mineralocorticoides- RM e de receptores glicocorticoides – RG, já que a retroalimentação negativa é regulada por estes

receptores. Os receptores mineralocorticoides possuem maior afinidade pelos corticosteroides, enquanto que os receptores glicocorticoides apresentam uma menor afinidade. Esses dois tipos de receptores estão expressos abundantemente na formação hipocampal (JOËLS & KARST, 2007).

A memória para eventos com componente emocional é melhor do que a para eventos neutros, em função do nível de atenção envolvido. Essa explicação é claramente adaptativa, visto que estímulos emocionais, sejam prazerosos ou aversivos, se mostram geralmente mais importantes para a sobrevivência das espécies, em função da ativação do sistema límbico (LUPIEN & MAHEU, 2007; WOLF, 2007). Animais que passaram por manipulação ou separação neonatal respondem de forma diferente ao estresse na vida adulta, desta forma é possível que ocorram diferenças em situações adaptativas que garantam a sobrevivência deste indivíduo no meio em que vive. Neste aspecto, considerando a memória para consolidação destes eventos, a extinção de uma situação ou sua permanência, seja prazerosa ou aversiva, estaria diretamente relacionada com o grau de importância que o indivíduo atribui à situação para sua permanência em determinado ambiente.

As memórias criadas envolvendo fatores emocionais estabelecem-se através da amígdala e são mais resistentes à extinção e ao esquecimento. As respostas emocionais influenciam a memória, pelo menos em parte, através da amígdala, modulando o armazenamento da memória de longa duração (BIANCHIN *et al.*, 1999). Durante e imediatamente após eventos estressantes ou de intenso conteúdo emocional, vários sistemas são ativados no organismo, incluindo a liberação de vários hormônios (ROOZENDAL *et al.*, 1999). Existem evidências robustas de que a amígdala está envolvida na modulação da memória emocional de longa duração em estudos utilizando animais e humanos (McGAUGH, 2000). A amígdala regula os mecanismos de plasticidade sináptica, como demonstrado em alguns estudos, e está envolvida na modulação da formação da memória em outras áreas cerebrais, como o hipocampo e o córtex entorrinal (McGAUGH, 2000). Estudos mostram que a ativação da amígdala basolateral (Figura 2-B) aparece como pré-requisito para a modulação dos efeitos dos glicocorticoides em regiões do encéfalo como o hipocampo, pois lesões na amígdala basolateral interfeririam nesta modulação (WOLF, 2007).

Figura 2 – Localização da Amígdala basolateral (BLA) no cérebro.



(A) Localização da amígdala no cérebro do rato.

(B) Localização da amígdala basolateral no cérebro do rato (BLA).

Fonte: A – ANDRADE-FANDRÉ *et al.*, 2010

B – DERRICK L. HASSERT, retirado de <http://faculty.virginia.edu/behvr-neuro-lab/hassert.html>.

Uma facilitação dos processos de memória é observada quando os níveis de glicocorticoides se mostram moderados e convergem no tempo com o processo de aquisição de informações. Efeitos prejudiciais, porém, são encontrados quando os níveis de glicocorticoides estão altos ou muito altos, ocorrendo numa janela de tempo anterior ao desafio cognitivo. Estudos pioneiros mostram que glicocorticoides administrados 30 minutos antes de tarefas cognitivas prejudicam a evocação de memória de informações espaciais adquiridas (SANDI, 2011). Também é revelado um importante resultado utilizando o modelo da esQUIVA discriminativa no labirinto em cruz elevado, utilizado para observar a interação da ansiedade com a memória. Este experimento demonstra que existe um nível ótimo de ansiedade para que ocorra o aprendizado, considerando que tanto manipulações farmacológicas ansiolíticas (diminuem a ansiedade) quanto ansiogênicas (aumentam a ansiedade) trazem perdas quanto à retenção da memória. A administração de ambas demonstra um resultado nulo.

1.4 Evocação, extinção e recuperação da memória

O estágio de evocação da memória é fundamental para garantir a adaptação e sobrevivência do indivíduo ao meio, enquanto a extinção consiste na inibição ativa da evocação de uma memória, sendo importante para atribuir um novo significado a um ambiente sempre em mudança e para inibir a expressão de memórias que deixam de ser relevantes para um determinado ambiente (IZQUIERDO & CAMMAROTA, 2004).

A extinção da memória não representa a sua perda. Trabalhos mostram que a extinção parece se comportar como um novo aprendizado, dependendo de receptores NMDA e de estruturas como amígdala basolateral, hipocampo e córtex pré-frontal medial (CAMMAROTA *et al.*, 2005). A esQUIVA inibitória, tarefa em que um animal aprende a inibir uma determinada resposta (descer de uma plataforma, sair de um compartimento) para evitar um estímulo aversivo (McGAUGH, 2000) é particularmente fácil de extinguir, porque a realização de tal resposta significa o começo de uma extinção (VIANNA *et al.*, 2001; SZAPIRO *et al.*, 2002; CAMMAROTA *et al.*, 2004).

As memórias traumáticas, que envolvem emoções muito intensas, e se estabelecem através da amígdala, mostram-se mais resistentes à extinção e ao esquecimento (COSTANZI *et al.*, 2011). A intensidade da perturbação causada pelo estressor juntamente com a situação emocional em que se encontrava o indivíduo estressado influencia o grau em que tal estressor influenciará a memória. Outro hormônio liberado durante o estresse, a adrenalina (neuromoduladora), também influencia os mecanismos básicos de processamento da memória .

A evocação da memória pode desencadear dois tipos de processos: quando a informação é importante, ela será reconsolidada e mantida, caso contrário, será extinta. Estes processos mostram que a evocação da memória não é um processo passivo, ela define o rumo da informação adquirida, recrutando diversas cascatas bioquímicas em seu curso. O sentido biológico da reconsolidação da memória é acrescentar a essas memórias antigas novas informações ou manter as mesmas, enquanto a extinção se preocupa em formar uma nova memória, com significado diferente da memória original.

A extinção de uma resposta condicionada classicamente ocorre quando o estímulo condicionado é apresentado na ausência do estímulo incondicionado. A magnitude da resposta condicionada determinada pelo estímulo condicionado tende a desaparecer gradualmente conforme o estímulo condicionado vai sendo apresentado na ausência do estímulo incondicionado. Após a extinção, pode-se ainda observar uma eventual ocorrência da resposta condicionada frente ao estímulo condicionado através do processo chamado de recuperação espontânea. A extinção de memórias aversivas, como a tarefa do medo condicionado ao contexto, geralmente não persiste, devido à recuperação espontânea dessa memória. O contexto temporal no qual a extinção foi implementada assume controle sobre os efeitos desse procedimento. Na recuperação espontânea, o comportamento extinto em um determinado contexto reaparece nesse mesmo contexto após um período de tempo (CATANIA, 1998/1999). A recuperação espontânea determina a intensidade da memória adquirida para aquele indivíduo.

2 HIPÓTESE

Animais submetidos à manipulação neonatal apresentam comportamento de resposta ao estresse reduzido na vida adulta. Já animais submetidos à separação neonatal podem apresentar um comportamento de resposta ao estresse intensificado na vida adulta. Como o nível do estresse é modulador dos processos de memória, sendo necessário para a aquisição e a consolidação do aprendizado, e eventos com componente emocional demonstram melhor consolidação quando comparados a eventos neutros, acredita-se que animais separados quando avaliados em tarefas de memória aversiva possuam uma persistência da extinção desta memória menos robusta quando comparados à persistência da extinção dessa memória em animais controle ou manipulados.

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é estudar a persistência da extinção de memórias aversivas e apetitivas em ratos machos adultos submetidos a diferentes intervenções no período neonatal. Segue abaixo a descrição dos objetivos geral e específicos deste trabalho.

3.1 Objetivo Geral:

Verificar se a manipulação e a separação materna no período neonatal alteram a persistência da extinção de memória aversiva quando avaliada em relação à memória apetitiva.

3.2 Objetivos específicos:

- Verificar a persistência da extinção de memória aversiva em ratos machos adultos submetidos à manipulação e à separação neonatal.
- Verificar a persistência da extinção de memória apetitiva em ratos machos adultos submetidos à manipulação e à separação neonatal.
- Analisar as diferenças entre a persistência da extinção da memória aversiva e memória apetitiva entre grupos de ratos machos controle, manipulados e separados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Para o desenvolvimento deste estudo foram primeiramente utilizadas ratas Wistar prenhes provenientes do CREAL (Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul), randomicamente selecionadas. As ratas permaneceram, individualmente, em caixas-moradia, confeccionadas em *Plexiglas* medindo 65 x 25 x 15 cm, com assoalho recoberto de maravalha, e foram mantidas em um ambiente controlado: ciclo normal claro/escuro de 12 horas (luzes acesas entre 7 e 19h), temperatura de 22 + 2°C, limpeza das caixas uma vez por semana, água e ração padrão *ad libitum*. As mesmas permaneceram nas caixas-moradia com seus filhotes até o desmame. Cada caixa continha apenas uma ninhada com a mãe, padronizada em oito filhotes.

4.2 Grupos experimentais

No dia do parto (dia zero), cada mãe, juntamente com seus oito filhotes, foi separada em um grupo distinto, conforme ordem de nascimento. Este experimento utilizou três grupos de estudo, conforme descrito abaixo:

-Grupo Controle: permaneceram sem qualquer tipo de intervenção até o desmame (21° dia). A limpeza das caixas foi realizada duas vezes por semana por um pesquisador do experimento, afim de remover parte da maravalha suja da caixa e substituir por limpa, tomando o cuidado para não tocar nos filhotes nem na mãe presente na caixa.

-Grupo Manipulado no Período Neonatal: os filhotes passaram por um breve afastamento de suas mães por 10 min por dia dos dias 1 a 10 de vida. A mãe foi gentilmente afastada da ninhada, e em seguida todos os filhotes foram retirados da

caixa ao mesmo tempo, sendo imediatamente colocados em uma incubadora com temperatura ambiente de 32° C. A mãe permaneceu na caixa moradia ao lado da incubadora.

-Grupo Separado no Período Neonatal: os animais passaram por um afastamento da mãe, com o mesmo procedimento citado no grupo manipulado, porém este tempo de afastamento foi maior, separando-os de sua mãe por 3 horas por dia dos dias 1 a 10 de vida.

Aos vinte e um dias de vida, os animais foram desmamados e foi realizada sexagem dos grupos, onde foram usados para este experimento apenas os ratos machos. Estes ratos foram acondicionados em grupos de 4 ou 5 por caixa, utilizando no máximo 2 filhotes de cada mãe para evitar o “efeito ninhada”. Estes também foram mantidos em caixas-moradia com assoalho recoberto de maravalha, em um ambiente controlado: ciclo normal claro/escuro de 12 horas, temperatura de 22 + 2°C, limpeza das caixas duas vezes por semana, água e ração padrão *ad libitum*. Os testes comportamentais iniciaram na idade adulta, entre 4 e 5 meses de idade.

4.3 Experimentos comportamentais

Para avaliação comportamental do presente estudo, foram determinados dois tipos de tarefas: aversiva e apetitiva. Como tarefa aversiva foi utilizado medo condicionado ao contexto e como tarefa apetitiva, transmissão social da preferência alimentar. Abaixo segue a descrição de cada tipo de tarefa, da forma como foram conduzidas neste trabalho.

4.3.1 Tarefa aversiva – Medo Condicionado ao Contexto

Nesta tarefa, os animais foram expostos a um aparato adaptado a partir de uma caixa de esquia inibitória (Figura 3), um espaço de aproximadamente 20 cm x 30 cm x 30 cm, contendo uma lâmpada acesa de 60 W na parte lateral desta caixa.

Figura 3 – Aparato adaptado para Tarefa aversiva.



Fonte: Registrada pela autora, 2013.

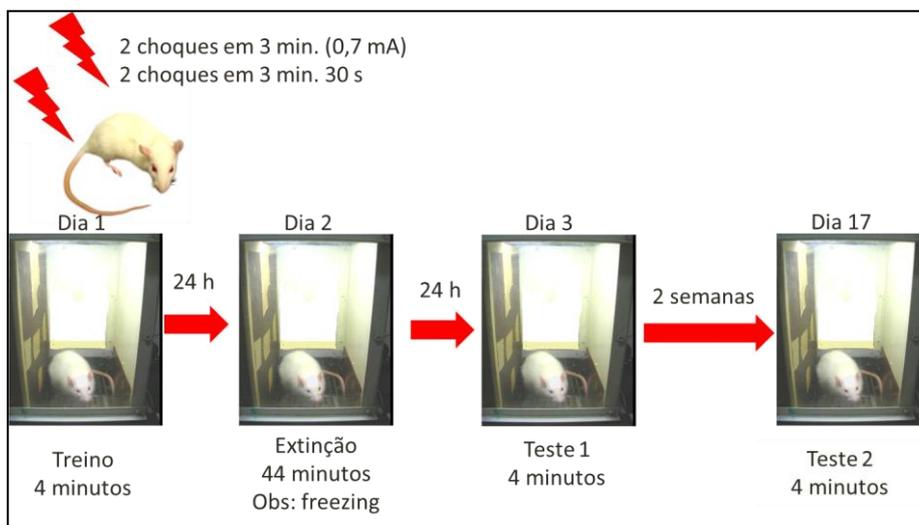
No primeiro dia da tarefa, o rato passou por uma sessão de treino, quando foi colocado nas grades metálicas que cobrem o chão deste aparato. Após fechar a caixa, 4 minutos foram contados (tempo de realização). Ao final de 3 minutos, o rato recebeu 2 choques de 0,7 mA por 3 segundos; e no tempo de 3 minutos e 30 segundos, mais 2 choques de mesmo tempo e intensidade. Aos 4 minutos o animal foi retirado da caixa e colocado de volta na caixa-moradia.

No dia seguinte, o animal foi novamente exposto a este contexto (T1), porém sem a presença do choque, e o tempo de imobilidade (medida de medo condicionado ao contexto - *freezing*) foi observado. Este tempo foi medido em intervalos de 4 minutos num tempo total de 44 minutos, tempo necessário para a

extinção desta memória. Após 24h, o animal foi novamente exposto ao contexto sem o choque, por 4 minutos, para verificar a permanência da extinção induzida no dia anterior.

Após 14 dias ao dia do T1, foi realizado o teste 2 (T2), quando o animal foi reexposto ao contexto sem o choque, por 4 minutos e o tempo de congelamento (*freezing*) foi medido, a fim de verificar a recuperação espontânea da memória referente à tarefa aversiva. O esquema experimental desta tarefa está representado na figura 4. Todos os dados foram registrados manualmente em planilha de acompanhamento pelo experimentador, utilizando o cronômetro para contagem do tempo. Na tarefa aversiva somente o tempo de *freezing* foi observado.

Figura 4 – Esquema experimental da Tarefa aversiva – Medo condicionado ao contexto.



Fonte: Elaborado pela autora, 2013.

4.3.2 Tarefa apetitiva – Transmissão social da preferência alimentar

Para realização desta tarefa, os animais de interesse no estudo (controle, manipulados e separados) foram denominados OBSERVADORES, e um novo grupo de animais (ratos machos adultos, de 3 a 4 meses de idade) sem nenhuma intervenção) foi apresentado com a denominação DEMONSTRADORES, com a

única função de apresentar ao grupo de observadores um determinado alimento (cominho), interagindo socialmente com os grupos de interesse. Cada observador possuía o seu demonstrador, sendo que este foi utilizado apenas uma vez para o contato social entre os grupos.

Os alimentos estabelecidos para este procedimento eram alimentos com dois tipos de tempero: cominho e tomilho. Os animais naturalmente preferem o cominho ao tomilho. Em um experimento controle, Lesburguères *et al.* (2011) demonstrou que quando o observador interage com um demonstrador que apenas comeu a ração padrão, ao invés de ração com cominho, no dia seguinte durante o teste a média de consumo do cominho é de 20%. Este foi o parâmetro que utilizamos para avaliar a memória destes animais.

Para a realização da tarefa, tanto os ratos demonstradores quanto os observadores passaram por restrição alimentar antes e durante o experimento.

Os animais DEMONSTRADORES foram habituados, durante 3 dias (sessão de 30 minutos) para comer ração em pó misturada com cominho (0,5%). A ração encontrava-se armazenada em um recipiente acessível ao animal em uma caixa-moradia. Da mesma forma, os animais OBSERVADORES também foram habituados durante 3 dias (sessões de 30 minutos) para comer ração padrão em pó (sem a presença do cominho), disposta em 2 recipientes iguais em uma caixa-moradia. Cada animal era exposto individualmente ao alimento na mesma caixa durante os 3 dias.

Após a habituação, no 4º dia, os DEMONSTRADORES passaram por mais uma sessão de 30 minutos expostos à ração padrão com cominho em um recipiente na caixa-moradia, sem acesso à água. Após a sessão, este animal foi removido para outra caixa, a qual era separada do meio por uma grade (Figura 5).

Figura 5 – Caixa de interação social separada com grade.



Fonte: Registrado pela autora, 2013.

Após o DEMONSTRADOR ser colocado na caixa separada por uma grade, no lado oposto ao que este se encontrava foi colocado o animal OBSERVADOR. A sessão de interação social com a presença da grade foi de 15 minutos (Figura 6). Passado este tempo, a grade foi retirada e os animais interagiram por mais 15 minutos, sendo que o cheiro do cominho seria sentido pelo animal observador na boca do animal demonstrador. Ao final deste período, os animais foram retirados da caixa e devolvido às respectivas caixas-moradia.

Figura 6 – Interação social de observadores e demonstradores



Fonte: Registrado pela autora, 2013.

Após 24h da sessão de 30 minutos de interação social, os animais OBSERVADORES são expostos a dois recipientes em uma caixa, um contendo ração padrão com cominho (0,5%), alimento reconhecido como familiar, já que foi sentido no co-específico, e outro contendo ração padrão com tomilho (0,75% - preferência inata), alimento novo. A posição do alimento familiar e do alimento novo (direita ou esquerda) dentro da caixa variou de forma aleatória dentro dos diferentes grupos. Após 20 minutos os recipientes foram removidos e pesados, para determinação da quantidade de ração familiar e ração nova ingeridas pelos animais.

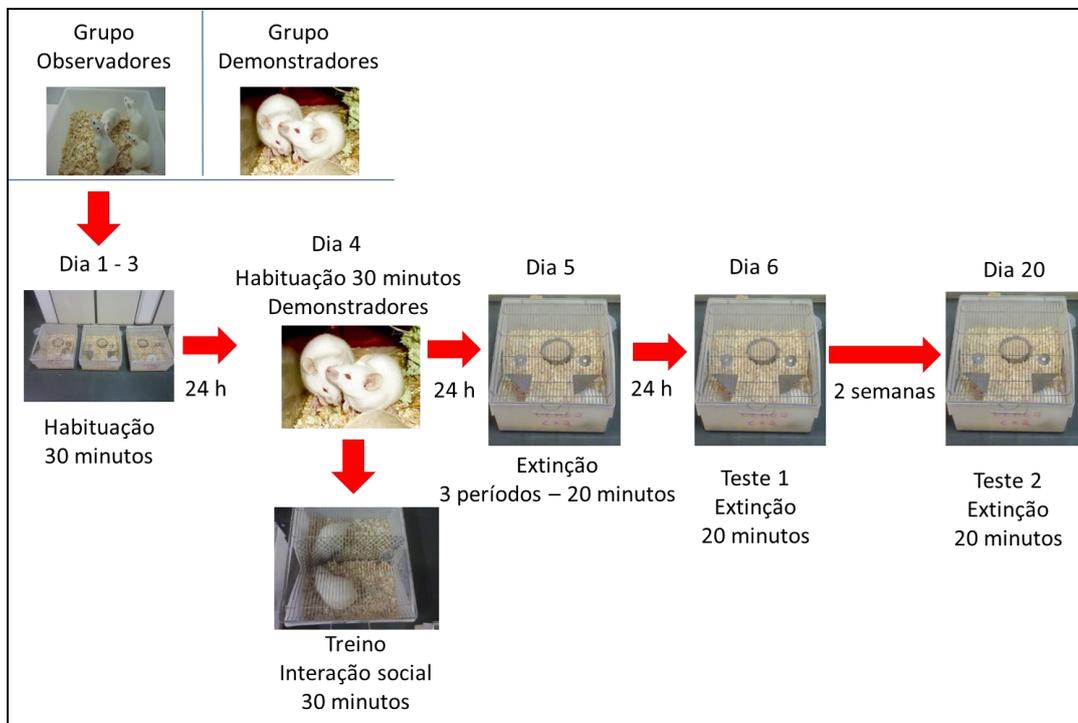
Para extinção desta memória, continuamos realizando sessões de 20 minutos de exposição aos dois tipos de ração, pesando os recipientes após cada sessão. No momento em que o consumo das rações se tornou semelhante ($50\% \pm 5$), foi considerado não haver mais preferência alimentar. Realizamos 3 sessões de 20 minutos para extinguir a preferência.

Após 24 horas foi realizado o Teste 1, onde a sessão de 20 minutos foi repetida e os recipientes com ração pesados ao final. Foi verificado se a extinção do dia anterior estava presente.

Após 14 dias, a mesma sessão de 20 minutos foi repetida para cada rato OBSERVADOR, expondo estes aos dois recipientes novamente, com ração padrão com cominho e ração padrão com tomilho. Nesta sessão (teste 2) foi verificado se houve recuperação espontânea desta memória. A figura 7 representa um esquema da realização da tarefa apetitiva.

Todos os dados foram registrados manualmente em planilhas de acompanhamento pelo experimentador, utilizando o cronômetro para contagem do tempo e a balança analítica para a pesagem das rações.

Figura 7 – Esquema experimental da Tarefa apetitiva: transmissão social da preferência alimentar.

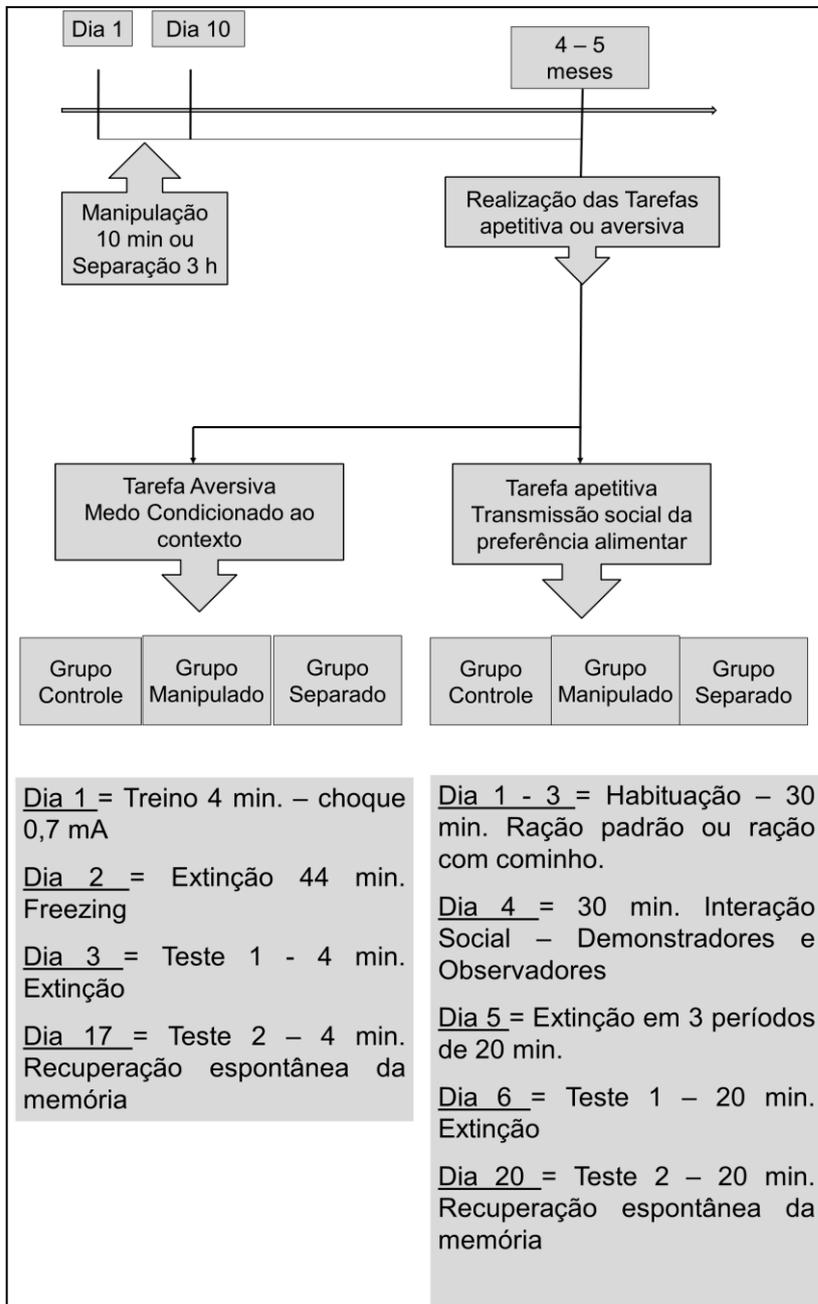


Fonte: Elaborado pela autora, 2013.

4.4 Desenho Experimental

O desenho experimental geral do presente estudo, incluindo as fases de intervenção neonatal e a realização das tarefas aversiva e apetitiva, está demonstrado na figura 8.

Figura 8 – Desenho experimental do estudo



Fonte: Elaborado pela autora, 2013.

4.5 Considerações Éticas

Os procedimentos executados neste projeto são de uso habitual por autores que trabalham e publicam na área e obedecem as normas propostas pelos Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences – CIOMS; GOLDIM & RAYMUNDO, 1997*). Conforme a classificação do grau de severidade de cada procedimento, publicada na página da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) de nossa Universidade, os procedimentos constantes neste estudo enquadram-se na categoria procedimento de severidade moderada (medo condicionado ao contexto) e de severidade leve (manipulação dos animais no período neonatal, colocando-os numa incubadora; exposição a estímulos nocivos associados brevemente com desconforto leve, que dure pouco tempo). O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais através do parecer nº21388.

4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por ANOVA Simples (*One way ANOVA*) e ANOVA de medidas repetidas, seguidas de post-hoc de Tukey, tanto para os resultados do medo condicionado ao contexto quanto para transferência social da preferência alimentar.

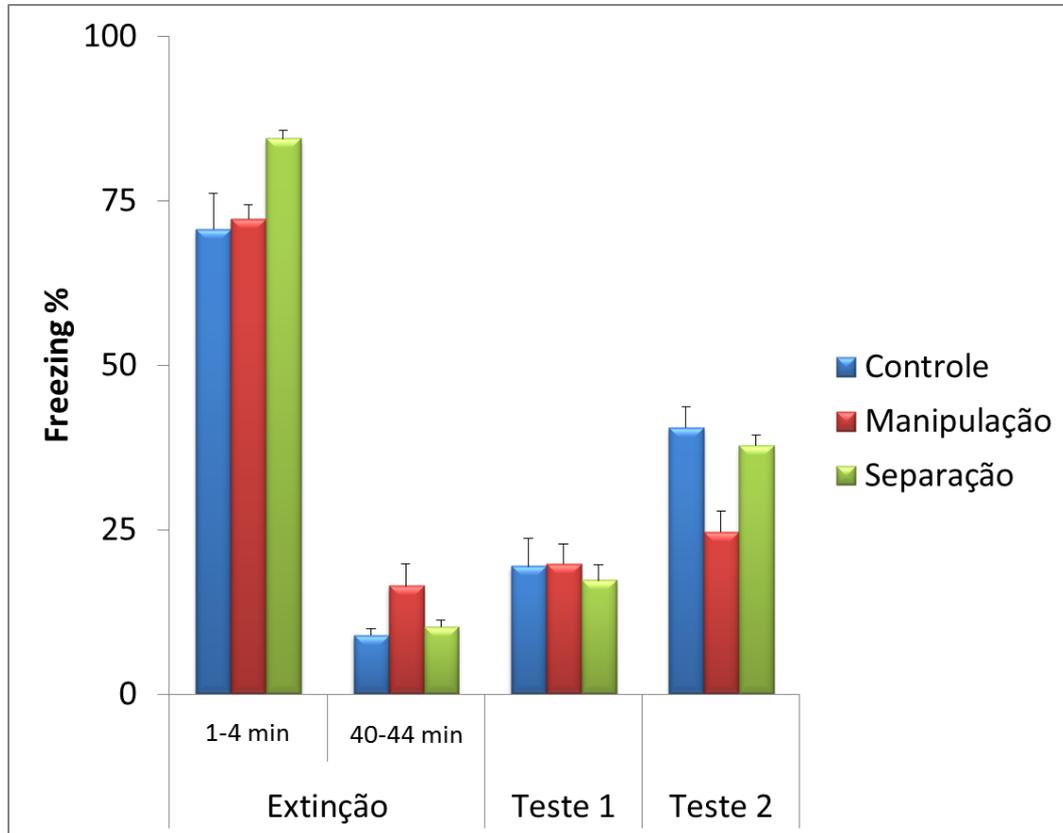
5 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram avaliados individualmente conforme a tarefa comportamental realizada, sendo apresentados como Tarefa aversiva e Tarefa Apetitiva. Os mesmos dados de cada experimento estão dispostos de duas formas: uma em que é realizada a comparação entre os grupos (controle, manipulação, separação) em cada sessão, e outra que facilita a comparação entre as sessões (Extinção, Teste 1, Teste 2) em cada grupo.

5.1 Tarefa Aversiva – Medo Condicionado ao contexto

Os animais foram reexpostos ao contexto da tarefa aversiva durante 44 minutos para induzir a extinção da memória, durante a qual a resposta de medo (freezing) e, portanto, a expressão da memória, foi avaliada em blocos de 4 minutos. No dia seguinte (teste 1) e 15 dias após (teste 2) os animais foram novamente reexpostos ao contexto (4 minutos) para avaliar a persistência dessa extinção. No gráfico 1 observamos os resultados da comparação entre os grupos, em cada sessão.

Gráfico 1 – Desempenho geral dos grupos experimentais na tarefa Medo condicionado ao contexto.



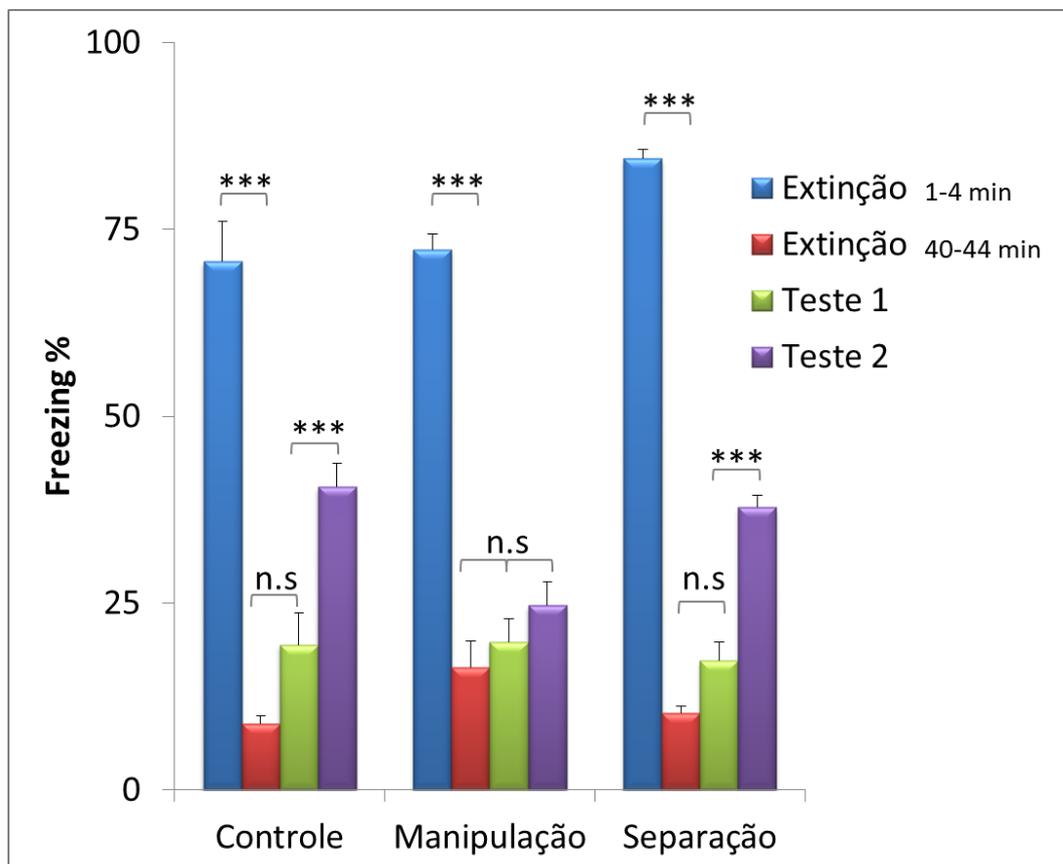
Fonte: Elaborado pela autora, 2013. ANOVA de medidas repetidas (Grupo: $p > 0,05$; Sessão: $p < 0,001$; Grupo x Sessão: $p < 0,001$) seguida por post-hoc de Tukey (não significativo).

Conforme demonstrado no Gráfico 1, no que se refere ao desempenho geral dos grupos experimentais na tarefa aversiva, houve interação significativa entre grupo x sessão ($P < 0,001$). O grupo controle e o grupo separado comportaram-se de maneira similar nas sessões, porém o grupo manipulado apresentou maior freezing nos primeiros 4 minutos da sessão de extinção. O grupo manipulado apresentou um comportamento diferente dos demais, pois o % de freezing nos últimos 4 minutos de extinção, embora tenha diminuído, sua média ainda se mostra maior que os demais grupos.

Os resultados deste congelamento nas sessões do grupo manipulado são muito similares, demonstrando talvez uma dificuldade de aprendizado.

O gráfico 2 mostra o desempenho de cada grupo em cada sessão e a significância entre o desempenho entre as sessões.

Gráfico 2 – Desempenho dentro de cada grupo experimental na tarefa de Medo condicionado ao contexto.



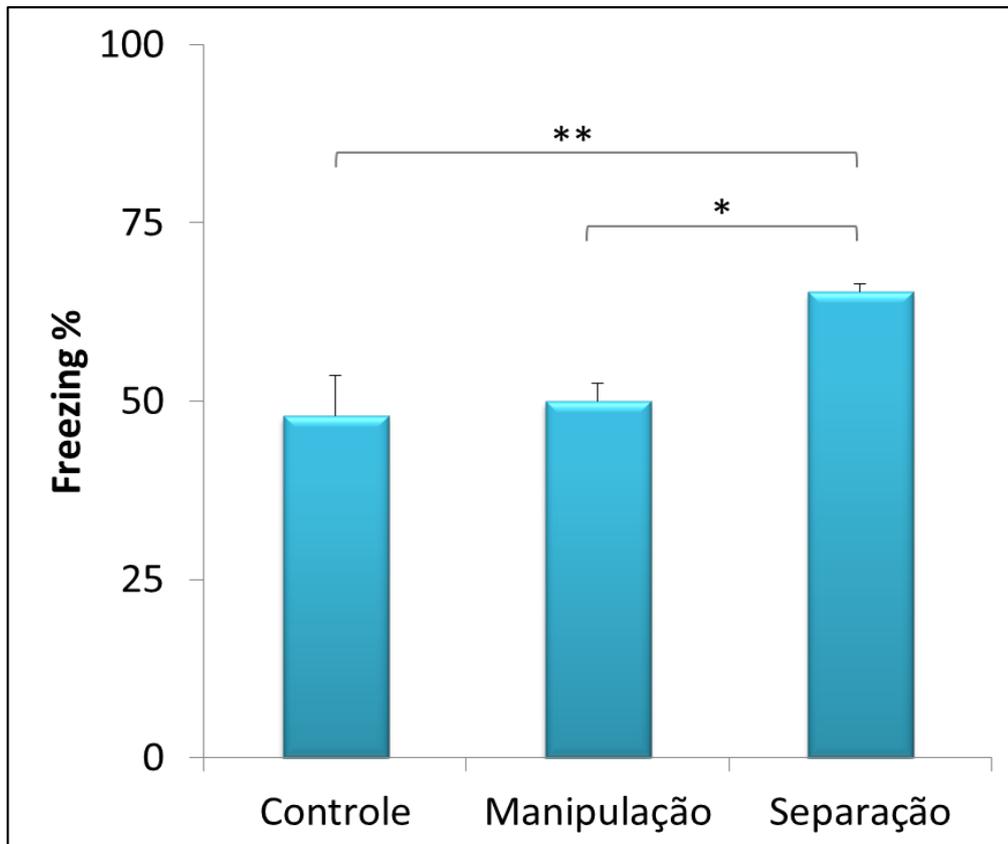
Fonte: Elaborado pela autora, 2013. ANOVA de medidas repetidas (Grupo: $p > 0,05$, Sessão: $p < 0,001$; Grupo x Sessão: $p < 0,001$) seguida por post-hoc de Tukey (** $p < 0,001$; n.s = não significativo).

No Gráfico 2 pode-se verificar uma alta porcentagem de freezing nos grupos controle, manipulados e separados nos primeiros 4 minutos (24h após o condicionamento) e aos 44 minutos, nesta mesma sessão de extinção, demonstra uma diminuição significativa no freezing, mostrando a eficácia na extinção desta memória ($p < 0,001$ para os três grupos) em todos os grupos. Após 24h (teste1) essa

extinção se manteve, pois o freezing foi estatisticamente semelhante ao encontrado aos 44 minutos ($p > 0,05$) nos três grupos avaliados. Após 15 dias (teste 2), tanto o grupo controle quanto o grupo separado demonstraram recuperação espontânea da memória aversiva ($p < 0,001$ Teste 2 x Teste 1). Já o grupo manipulado apresentou um comportamento semelhante ao teste 1, indicando que não houve recuperação espontânea desta memória e que a extinção ainda se mantém.

No Gráfico 3 é mostrado a média geral de freezing durante toda a sessão de extinção da tarefa aversiva, dentro de cada grupo experimental. Neste gráfico podemos observar que a média de resposta de medo na extinção foi maior no grupo de animais separados. Este mostrou uma diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle e também em relação ao grupo manipulado ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos controle e manipulados.

Gráfico 3 – Média geral de freezing por grupo durante a extinção



Fonte: Elaborado pela autora, 2013. ANOVA de uma via ($p < 0,01$) seguida por post-hoc de Tukey. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

5.2 Tarefa Apetitiva – Transmissão social de preferência alimentar

Para a tarefa apetitiva, a extinção foi realizada 24h após a sessão de interação social dos observadores com os demonstradores, quando estes aprendem uma preferência pela ração com cominho através do cheiro deste alimento na boca do demonstrador.

Para a extinção desta memória foram realizadas 3 sessões de 20 minutos cada com disponibilização dos 2 tipos de alimentos para cada animal observador (ração padrão+cominho / ração padrão+tomilho), em dois recipientes distintos. Após cada sessão, foi medido através de pesagem o consumo bruto (*) e o relativo de cada tipo de alimento. Isto foi determinado através da fórmula abaixo:

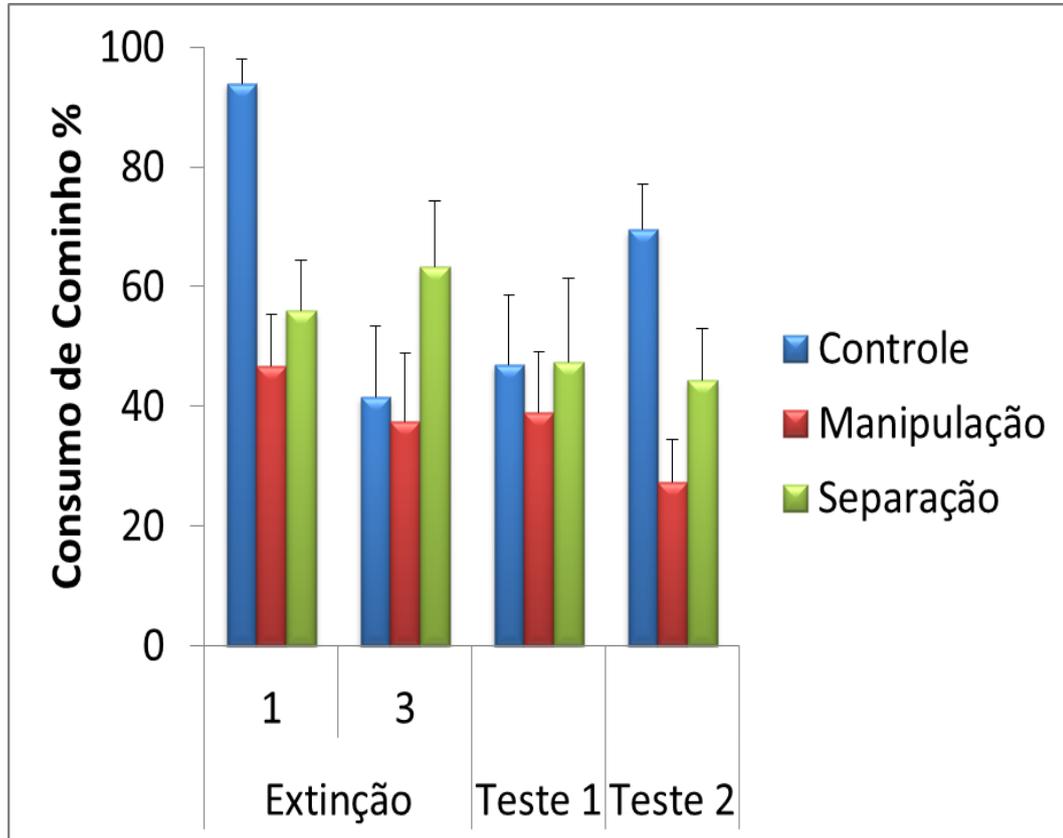
Consumo relativo (%) =

$$\frac{\text{consumo da ração com cominho}}{\text{consumo da ração com cominho} + \text{consumo da ração com tomilho}}$$

(*) Consumo (mg) = peso pré sessão - peso pós sessão

Foi utilizado como parâmetro de aprendizado o consumo basal da ração de cominho (20%) apresentado por animais controle (observadores não expostos ao cheiro de cominho na sessão de interação) conforme Lesburguères *et al.* (2011). O Gráfico 4 mostra o consumo de ração padrão com cominho, enfatizando a comparação entre os grupos em cada sessão.

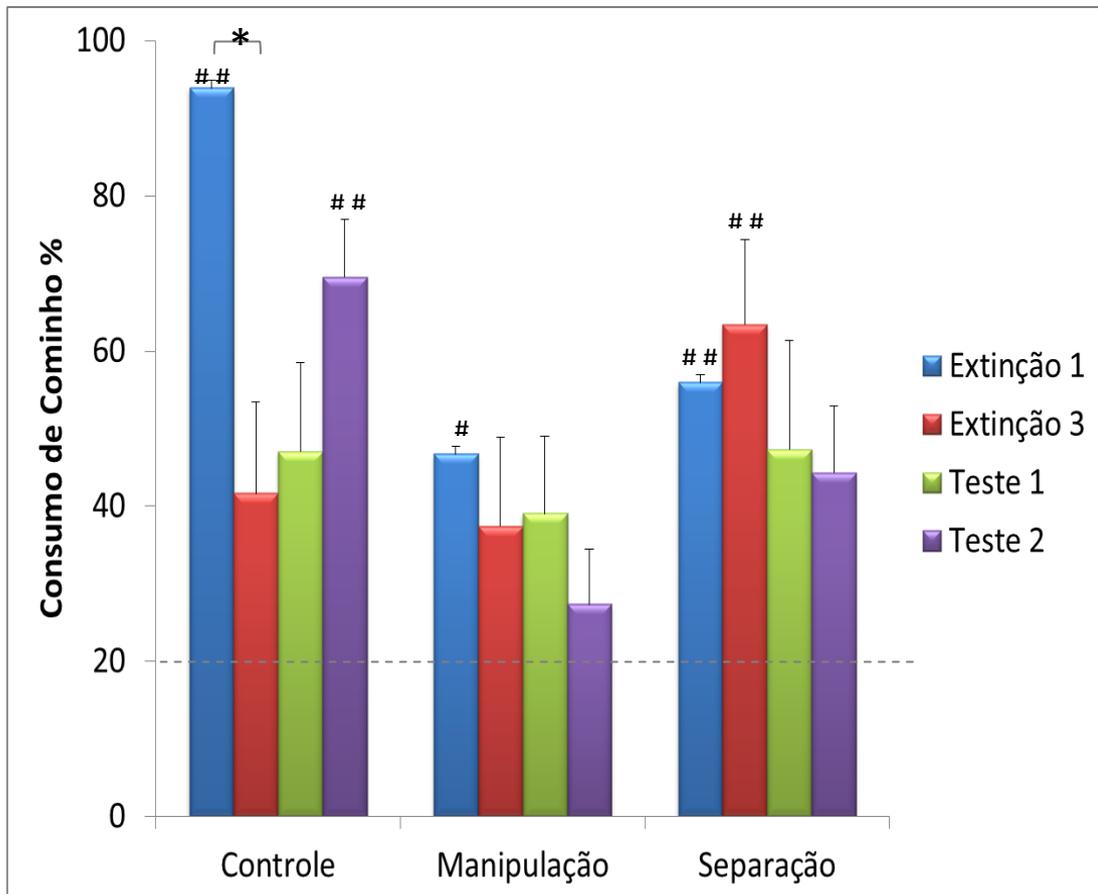
Gráfico 4 – Consumo de ração padrão com cominho nos diferentes grupos durante o experimento.



Fonte: Elaborado pela autora, 2013. ANOVA de medidas repetidas (Grupo: $p < 0,05$, Sessão: $p < 0,05$; Grupo x Sessão: $p < 0,05$) seguida por post-hoc de Tukey (não significativo).

Como podemos observar no gráfico 4, no que se refere ao desempenho geral dos grupos experimentais na tarefa apetitiva, houve interação significativa entre grupo x sessão ($P < 0,05$). O grupo controle apresentou aprendizado, extinguiu esta memória e obteve recuperação espontânea. Embora o desempenho dos grupos não tenha se mostrado estatisticamente significativo, os grupos manipulado e separado comportarem-se diferentemente do grupo controle ao longo das sessões, como se comentará no gráfico 5.

Gráfico 5 - Consumo de ração padrão com cominho dentro dos grupos durante o experimento.



Fonte: Elaborado pela autora, 2013. ANOVA de medidas repetidas (Grupo: $p < 0,05$, Sessão: $p < 0,05$; Grupo x Sessão: $p < 0,05$) seguida por post-hoc de Tukey ($*p < 0,05$); e *t-test* ($\#p < 0,05$; $\#\# p < 0,01$ em relação à linha basal).

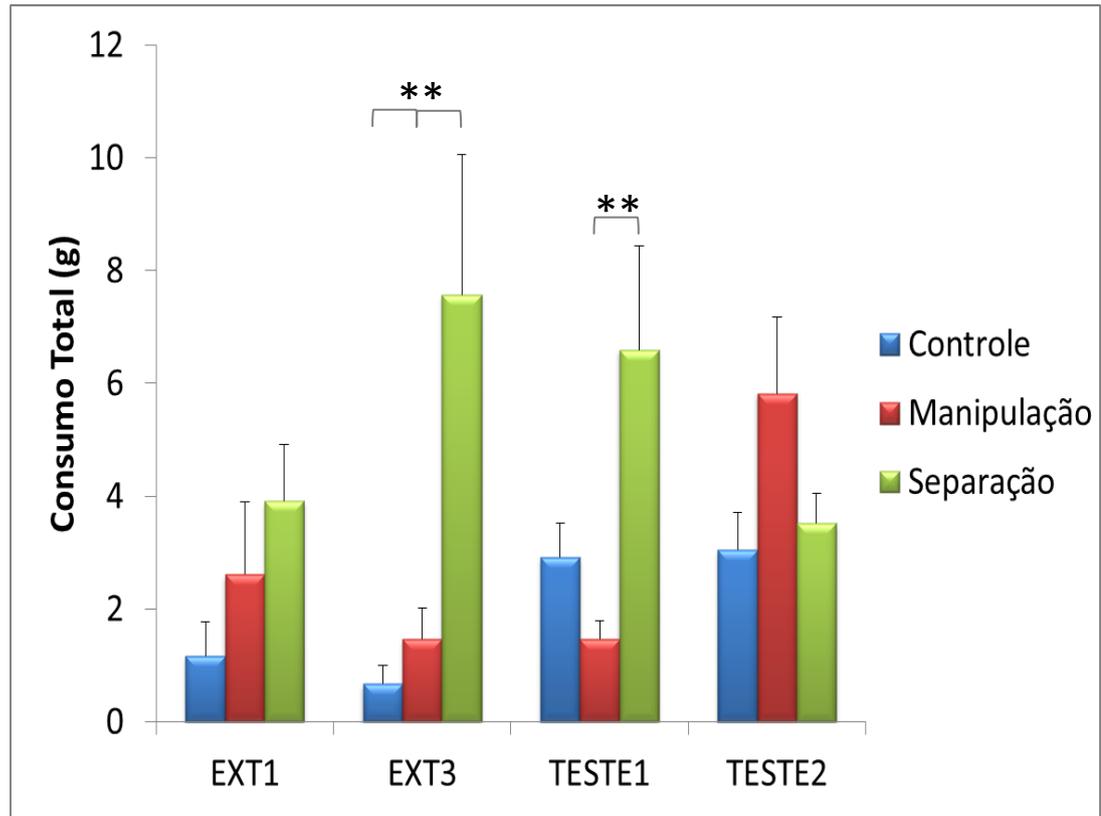
Pode-se observar que o grupo controle mostra uma diferença significativa entre a primeira sessão de extinção e a terceira, e que desta forma mostra que, houve extinção efetiva da memória apetitiva. Da terceira sessão de extinção para o teste 1, não houve diferença significativa, mostrando que a extinção se manteve. Do teste 1 para o teste 2 (15 dias após), estatisticamente não houve diferença ($p > 0,05$), porém demonstra aumento em média maior que do teste 1, demonstrando uma leve recuperação espontânea da memória. Os grupos manipulados e separados não apresentaram diferenças significativas entre nenhuma das sessões (dentro do próprio grupo). Houve aprendizado tanto no grupo manipulado como no separado, porém a extinção no grupo manipulado se mostra fraca, já que a média do consumo inicial do grupo também se mostra menor em comparação aos grupos separado e

controle. Não existe diferença estatística entre os grupos controle e manipulado entre suas sessões de extinção e teste 1, mostrando uma eficiência na extinção desta memória. O grupo separado aumentou o consumo durante as sessões de extinção e a diferença para seu Teste 1 não se mostra significativa, indicando deficiência na extinção, mantendo um resultado similar no teste 2.

Em relação ao consumo basal de 20%, o grupo controle demonstra aprendizado na primeira sessão de extinção ($p < 0,01$), que ocorre 24h após a sessão de interação, e na extinção 3 já não há mais expressão de preferência. No teste 1 ocorre diferença, $p=0,046$, mostrando uma leve recuperação da preferência e 15 dias após, no teste 2, ocorre recuperação da preferência alimentar significativa ($p < 0,01$). No grupo manipulação também foi observado aprendizado na sessão 1 da extinção ($p < 0,01$), e na extinção 3 não há expressão significativa da preferência. No teste 1 também não apresenta diferença, mostrando ainda não haver expressão de preferência e igualmente observado no teste 2, sem expressão de preferência, não havendo recuperação espontânea. O grupo separação demonstra aprendizado na primeira sessão de extinção, pois apresentou resultado estatístico significativo ($p < 0,01$), e na extinção 3 esse aprendizado se manteve ($p < 0,01$), já que houve um aumento do consumo. No teste 1 o grupo não expressou mais preferência alimentar ($p = 0,08$), da mesma forma que no teste 2 ($p > 0,05$), porém é importante ressaltar que não houve extinção efetiva da memória e essa se mantém.

Considerando o consumo bruto total de alimento (cominho e tomilho) dos grupos em cada sessão (Gráfico 6) observamos o seguinte: Na extinção 1 não houve diferença entre os grupos; na extinção 3 o grupo separação consumiu significativamente mais do que os grupos controle e manipulação ($p < 0,01$); no teste 1 o grupo separação também consumiu mais do que o grupo manipulado ($p < 0,01$), mas não teve diferença significativa com o grupo controle ($p = 0,069$) e no teste 2 não houveram diferenças.

Gráfico 6 – Comparação com a preferência basal



Fonte: Elaborado pela autora, 2013. ANOVA simples ($p < 0,05$) seguida por post-hoc de Tukey (** $p < 0,01$).

6 DISCUSSÃO

Experiências precoces podem alterar a relação mãe-filhote e modificar o comportamento de ambos no período neonatal. Como já exposto, neste trabalho utilizamos a manipulação e a separação materna como intervenções neonatais. É de conhecimento que a separação da mãe por períodos curtos (manipulação) leva a uma diminuição da resposta ao estresse na vida adulta dos filhotes, enquanto a separação por períodos longos (separação) pode levar a uma resposta exagerada ao estresse neste mesmo período. Os presentes resultados demonstram aspectos comportamentais de animais controle, manipulados e separados quando expostos a situações aversivas ou apetitivas na vida adulta. Essas tarefas são tão dependentes do nível de perturbação ambiental como da memória. Os resultados serão discutidos de forma individual, finalizando com uma discussão geral quanto à atuação dos diferentes grupos nas etapas semelhantes de cada tarefa.

6.1 Tarefa aversiva – Medo condicionado ao contexto

Os resultados demonstram que a apresentação de um estímulo condicionado ao contexto, juntamente com um componente aversivo, neste caso o choque, produz uma memória aversiva associativa de longa duração, em um processo denominado condicionamento aversivo. O tempo utilizado para a extinção dessa memória no presente trabalho foi de 44 minutos, superior a outros trabalhos que trazem 25-30 minutos como tempo necessário para esta extinção (DE OLIVEIRA ALVARES, L. *et al.* 2008; 2012). Essa dificuldade relacionada à extinção pode estar relacionada com o perfil dos animais experimentais utilizados e às condições às quais eles são expostos. O processo de extinção, porém, foi obtido com sucesso após esse período o, nos três grupos experimentais, como verificado pelo Teste 1.

Durante o processo de extinção, observamos que o grupo manipulado se comportou de forma semelhante ao grupo controle, porém o grupo separado apresentou uma média na resposta ao medo maior, já que observando sua curva de extinção, demonstrou freezing maior que os outros grupos nos blocos de 4 minutos,

embora também tenha obtido extinção em 44 minutos. Esse resultado pode estar vinculado a própria resposta ao estresse aumentada na vida adulta dos animais separados, e desta forma intensificaram a reação frente ao choque exposto 24h antes.

Houve recuperação espontânea da memória aversiva no grupo controle, bem como todas as outras fases da tarefa se mostraram como o esperado. O grupo separado apresentou uma resposta semelhante ao grupo controle, também apresentando recuperação espontânea 15 dias após o Teste 1. Estes resultados indicam que o grupo separado possui uma forte percepção de eventos aversivos, fazendo com que a extinção desta memória não permaneça quando os animais são expostos, mesmo após um espaço de tempo, a uma situação potencialmente ameaçadora, mostrando uma melhor preparação adaptativa para eventos aversivos que possam comprometer sua sobrevivência na natureza. Existe uma aparente concordância de que ratos machos que passaram por separação materna no período neonatal apresentam um aumento do comportamento do tipo ansioso, comparado a ratos manipulados, em uma série de tarefas comportamentais, como campo aberto, labirinto em cruz elevado, condicionamento de sobressalto, teste de supressão alimentar induzida por novidade (MCINTOSH *et al.*, 1999; WIGGER e NEWMANN, 1999; CALDJI *et al.*, 2000), demonstrando maior susceptibilidade a eventos negativos e neste caso, maior facilidade na consolidação destes eventos.

Quando a transição entre a aquisição e a consolidação assume seu lugar no processo, os glicocorticoides auxiliam na estabilização da informação adquirida, promovendo mudanças funcionais e estruturais extremamente duradouras. Foi demonstrado também que a frequência de disparo neuronal no hipocampo é suprimida pelos glicocorticoides, fortalecendo a consolidação através da prevenção da entrada de novos estímulos (PFAFF, *et al.*, 1971). Os glicocorticoides parecem não influenciar o desempenho na evocação de memórias em situações sem carga emocional, sugerindo uma ação coordenada entre os eixos simpato-adrenal e HPA, reforçando a interação entre estes dois sistemas e o papel do estresse no gerenciamento das memórias aversivas (KUHLMANN e WOLF, 2006).

6.2 Tarefa apetitiva - Transmissão social de preferência alimentar

Os resultados do presente trabalho demonstram que a tarefa foi replicada conforme o esperado, pois todos os animais apresentaram um consumo preferencial pela ração com cominho, acima do esperado pelo acaso, após a interação com o demonstrador durante o treino.

O protocolo de extinção aqui testado atendeu aos requisitos básicos para demonstração desse fenômeno e parece ser eficiente, conforme indicado pelo comportamento do grupo Controle. O grupo controle mostrou supressão significativa da preferência alimentar durante a última sessão de extinção, e já não demonstrava nenhuma preferência significativa nesse período e no Teste 1 esse padrão se manteve. No teste 2, apesar de não existir diferença significativa em relação ao teste 1, os animais voltaram a expressar uma preferência acima do acaso que não estava presente nem na última sessão de extinção nem no teste 1, indicando então uma recuperação espontânea da memória. Houve uma leve diferença entre a última sessão de extinção e o teste 1 ($p=0,046$), indicando já uma recuperação iminente. Talvez, se a extinção tivesse sido mais extensiva (maior número de sessões e/ou dias), a supressão da memória tivesse sido mais robusta e a sua expressão no teste 1 teria sido menor, o que favoreceria uma diferença significativa em relação ao teste 2. No entanto, essa não foi a opção de escolha porque, como a tarefa envolve comportamento apetitivo, os animais poderiam se saciar rapidamente caso o número de sessões no mesmo dia fosse muito grande. Aumentar o número de dias também não seria uma boa opção, porque os animais já ficam muito tempo seguido em restrição alimentar (6 dias), o que poderia ser estressante. Além do mais, para avaliação da memória e possíveis intervenções farmacológicas e/ou comportamentais no futuro, é ideal restringir a tarefa temporalmente de modo a permitir manipulações pontuais mais confiáveis. Adicionalmente, um protocolo que não seja nem fraco nem forte demais possibilita a observação de efeitos tanto facilitadores quanto amnésicos do processo. De forma geral, então, acreditamos que a tarefa e o protocolo de extinção foram satisfatoriamente padronizados e podem ser utilizados em pesquisas futuras.

Infelizmente, porém, o desvio padrão dos grupos foi muito grande, dificultando a interpretação dos resultados. Para testes futuros, cogitamos a realização de

alguns ajustes na técnica, como fixar os potes, restringir a mistura de maravalha com a ração, delimitar um local experimental isento de som, ajustes esses que se fazem necessários para facilitação e melhoria do experimento.

Uma das causas do alto desvio pode ter sido justamente em função do barulho durante o experimento, já que a sala de experimentação era dividida com outros experimentadores e era maior do que a sala onde foi realizada a tarefa aversiva. Outro fator que pode ter contribuído para a dificuldade dos resultados obtidos, bem como da sua interpretação, é que, no artigo no qual nos baseamos, os animais eram treinados na própria caixa-moradia, pois naquele laboratório os animais eram condicionados isoladamente em cada caixa, porém no nosso laboratório os animais permaneciam em grupos de 4-5 animais por caixa, só sendo isolados no momento da habituação e testes, e isolá-los para realização da tarefa causaria um nível de estresse maior, o que também poderia interferir nos resultados já que estes animais já passaram por intervenções neonatais. Assim sendo, os animais não apresentavam igual habituação ao ambiente de treinamento quanto os animais do artigo utilizado como referência.

Observamos, contudo, um padrão de comportamento nos grupos, mostrando que há interação. O grupo manipulado demonstrou aprendizado significativo da tarefa, mas aparentemente em menor escala do que o grupo controle. Como o aprendizado já não era robusto inicialmente, não houve muita diferença em relação à última sessão de extinção, mascarando uma possível comparação significativa da resposta alimentar. Adicionalmente, os animais não mais demonstram preferência significativa na última sessão de extinção, no teste 1 e no teste 2. Esse padrão sugere que a memória nesse grupo possa ter sido prejudicada desde o aprendizado inicial, já que não demonstrou um consumo robusto. Estes resultados podem ter se apresentado desta forma devido ao baixo nível de resposta ao estresse deste animais na vida adulta, o que dificulta o grau de atenção, por isso um aprendizado em menor escala do que o grupo controle e conseqüentemente, maior facilidade na extinção, já que o aprendizado, mesmo sendo observado, não se mostrou forte.

Outra possibilidade em relação ao fato de que o grupo manipulado apresentou um aprendizado em menor escala do que o grupo controle poderia envolver reduzida interação social investigativa entre os animais, uma observação relatada anteriormente na literatura (TODESCHIN *et al.*, 2009). Assim, é possível

que os animais apresentem menor interação social com o demonstrador, o que levaria a um menor aprendizado dessa tarefa.

O grupo dos separados demonstrou aprendizado significativo, mas aparentemente também em menor escala do que o grupo controle. Esses animais foram expostos a um outro animal para o aprendizado, animal esse com o qual nunca haviam tido contato, ou seja, essa situação foi apresentada como um ambiente novo, com a presença de um animal não familiar, o que pode ter alterado o nível de estresse e desviado a atenção do aprendizado quanto ao alimento, devido ao componente emocional da interação social. A memória nesse grupo, porém, se mostrou resistente, pois os animais continuaram a expressar preferência significativa pelo cominho na última sessão de extinção, indicando que a memória não foi extinta. No entanto, essa preferência deixa de ser expressa no Teste 1 e no Teste 2, e não há diferença entre as sessões. Podemos interpretar esses resultados de duas formas diferentes. Primeiro, é possível que exista sim uma preferência, mas a memória não foi detectada devido à variabilidade grande do grupo. Nesse caso, a memória seria mais resistente à extinção. Alternativamente, é possível que haja a supressão da resposta, mas como o aprendizado não havia sido muito robusto, não haveria diferença significativa. No entanto, levando-se em conta os resultados da tarefa aversiva, onde os animais não demonstraram maior eficiência na extinção do que os controles, é possível que a primeira explicação seja a mais provável. Na tarefa apetitiva, o protocolo foi mais ameno, possibilitando como comentamos anteriormente, tanto resultados acima ou abaixo do nível do controle. Apesar disso, é sabido que intervenções durante o desenvolvimento afetam diferentemente distintos tipos de memória, e é prematuro tirarmos conclusões gerais em relação à extinção desses dois tipos de memória.

6.3 Tarefa aversiva x Tarefa apetitiva

A tarefa aversiva utilizada neste estudo, medo condicionado ao contexto, é uma tarefa já bem estabelecida e muito utilizada na literatura, com resultados de fácil visualização. No entanto, a tarefa apetitiva aqui utilizada, transferência social de preferência alimentar, é um experimento ainda pouco divulgado e a parte referente

à extinção foi protocolada pelos pesquisadores envolvidos no presente estudo. Desta forma, enquanto em uma das tarefas os resultados são claros e de interpretação direta (aversiva), na tarefa apetitiva os resultados mostraram-se menos regulares e de interpretação mais complexa, visto que deverá passar por ajustes para experimentos futuros.

Conseguimos observar a partir das tarefas realizadas neste trabalho que o grupo controle demonstrou um comportamento semelhante e esperado nos dois tipos de tarefa. Evidenciamos aprendizado significativo nas duas tarefas, eficiência na extinção, conforme teste 1 e recuperação espontânea da memória aversiva. Embora esta última etapa não tenha sido significativa na tarefa apetitiva, há um aumento visível no consumo da ração com cominho no teste 2, mostrando uma recuperação espontânea.

O grupo manipulado apresentou aprendizado nos dois tipos de tarefa, e extinção satisfatória. Tanto na tarefa aversiva como na apetitiva, não houve recuperação espontânea da memória. Já que na vida adulta estes animais apresentam um comportamento do tipo ansioso menor, percebemos que estes demonstram tanto um medo menos intenso à situações aversivas quanto uma menor importância às situações apetitivas. Adaptativamente este resultado é preocupante, podendo estes animais terem sua sobrevivência comprometida devido ao baixo grau de atenção destinado tanto a presença de situações predadoras como em situações que envolvam condições para preservação da vida (alimento, convívio social, etc), já que sua memória não se mantém em nenhum dos casos.

O grupo separado também demonstrou aprendizado nas duas tarefas, sendo que na tarefa aversiva se comportou de forma semelhante ao grupo controle, aprendendo a tarefa, extinguindo com eficiência e apresentando recuperação espontânea. Já na tarefa apetitiva esse grupo demonstrou deficiência no processo de extinção, porém não por deficiência de aprendizado, mas sim em esquecer o que foi aprendido, mantendo essa memória ao longo do tempo (recuperação espontânea), pois não chegou a extingui-la. Desta forma observamos que o grupo separado, por ter dificuldade com a extinção da tarefa apetitiva, confere uma maior importância ao consumo alimentar que é seguro para sua sobrevivência (ou seja, foi seguramente consumida por um co-específico) , sendo esta informação relevante demais para ser extinta neste grupo.

7 CONCLUSÃO

Concluimos através deste trabalho que ratos machos adultos que foram manipulados no período neonatal possuem um aprendizado satisfatório na tarefa aversiva e um aprendizado fraco na tarefa apetitiva, não havendo recuperação espontânea em nenhuma das duas tarefas. Já os ratos machos adultos que foram separados no período neonatal apresentaram uma aprendizagem consistente na tarefa aversiva e uma eficiência relativa no processo de aprendizado na tarefa apetitiva, já que essa se mostrou persistente ao longo do tempo avaliado. Ratos machos manipulados e separados no período neonatal apresentam comportamentos diferenciados tanto na tarefa apetitiva quanto na tarefa aversiva quanto à persistência dessas memórias, sendo que a memória mais robusta foi observada na tarefa apetitiva do grupo separado, dentro dos parâmetros aqui estudados.

REFERÊNCIAS

AISA, B.; TORDERA, R.; LASHERAS, B.; DEL RIO, J. ; RAMIREZ, M. J. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2006. 32: 256-266.

ANAND K. J. S.; SCALZO, F. M. Can adverse neonatal experience alter brain development and subsequent behavior? *Biology of the Neonate Review*. v. 77, p.69-82, 2000.

ANDRADE-FRANZÉ, G. M. F.; ANDRADE, C. A. F.; DE LUCA Jr., L. A.; DE PAULA, P. M. et al. Lesions in the central amygdala impair sodium intake induced by the blockade of the lateral parabrachial nucleus. *Brain Research* 2010, 1332: 57-64.

BAUDRY, M. Synaptic plasticity and learning and memory: 15 years of progress. *Neurobiol Learn Mem* 1998. 70(2): 113-118.

BIAGINI, G.; MERLO, E.; CARANI, C.; MARRAMA, P., AGNATI, L. F. Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. *Int. J. Dev. Neurosci.* 1998. 16: 187–197.

BIANCHIN, M.; MELLO E SOUZA, T.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not in working or short-term memory. *Neurobiol Learn Mem* 1999. 71 (2): 127-131.

CALDJI, C.; TANNENBAUM, B.; SHARMA, S.; FRANCIS, D.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998. 95, p. 5335–5340.

CALDJI, C.; FRANCIS, D.; SHARMA, S.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. The effects of early rearing environment on the development of GABAA and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology* 2000. 22:219–229.

CAMMAROTA, M.; BARROS, D. M.; VIANNA, M. R.; BEVILAQUA, L. R.; COITINHO, A.; SZAPIRO, G.; et al. The transition from memory retrieval to extinction. *An Acad Bras Cienc*. 2004. 76:573-82.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L. R., ROSSATO, J. I.; RAMIREZ, M.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiol Learn Mem.* 2005. 84:25-32.

CATANIA, A. C. *Aprendizagem: comportamento, linguagem e cognição*. Trad. de D.G. Souza. Porto Alegre: Artes Médicas. 1998/1999.

CHARMANDARI, E.; KINO, T.; SOUVATZOGLOU, E.; CHROUSOS, G. P. Pediatric stress: hormonal mediators and human development. *Horm. Res.* 2003. 59:161-179.

COSTANZI, M.; CANNAS, S.; SARAULLI, D.; ROSSI-ARNAUD, C.; CESTARI, V. Extinction after retrieval: Effects on the associative and nonassociative components of remote contextual fear memory. *Learn. Mem.* 2011. 18: 508-518.

CREWS F.; HODGE C. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav.* 86(2):189-99. 2007

DALLMAN, M. F. Glucocorticoid Negative Feedback. *Encyclopedia of Estress.* 1 ed. v. 2, p 224-228, 2000.

DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; SCRIBNER, K. S.; PECORARO, N.; LA FLEUR, S. E.; HOUSHYAR, H.; GOMEZ, F. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2004. 1018, p.141-150.

DENENBERG, V. H.; ROSENBERG, K. M.; PASCHKE, R.; ZARROW, M. X. Mice reared with rat aunts: effects on plasma corticosterone and open field activity. *Nature.* 1969. 221: 73-74.

DE OLIVEIRA ALVARES, L.; PASQUALINI GENRO, B.; DIEHL, F.; MOLINA, V. A.; QUILLFELDT, J. A. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience.* 2008. 154(4): 1648–1655.

DE OLIVEIRA ALVARES, L. *Participação do sistema canabinóide endógeno hipocampal na consolidação, reconsolidação e extinção da memória de ratos*. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.

DE OLIVEIRA ALVARES, L.; EINARSSON, E. Ö.; SANTANA, F.; CRESTANI, A. P.; HAUBRIC, J., CASSINI, L. F., NADER, K., et al. Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus.* 2012. 22(5): 1092–5.

FRANCIS, D. D.; DIORIO, J.; LAPLANTE, P.; WEAVER, S.; SECKL, J. R.; MEANEY, M. J. The role of early environmental events regulating neuroendocrine development. *Annals New York Academy of Sciences*, 1996.794: 136-152.

FRANCIS, D. D.; CALDJI, C.; CHAMPAGNE, F.; PLOTSKY, P.M.; MEANEY, M. J. The role of corticotropin-releasing factor-norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavior and endocrine responses to stress. *Biology Psychiatry*.1999. v.46, p. 1153-1166.

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

FRANCIS, D. D.; MEANEY, M. J. Maternal care and the development of stress responses. *Cur Op Neurobiol*. 1999. 9 (1), p. 128-134.

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.

GONZALES, 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. I. Effects on forced swim behavior and endocrine responses. *Physiology & Behavior*. 1990. 47, 4, p. 735-741.

GOULD, E.; TANAPAT, P.; McEWEN, B. S.; FLÜGGE G.; FUCHS, E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1998. 95(6): 3168-3171.

HASSERT, D. L. Ilustração do cérebro de rato, retirado de <http://faculty.virginia.edu/behvr-neurolab/hassert.html>.

HILAKIVI-CLARKE, L. A.; TURKKA, J.; LISTER, R. G.; LINNOILA, M. Effects of early postnatal handling on brain beta-adrenoceptors and behavior in tests related to stress. *Brain Res* 1991. 542:286–292.

HOFER, M. A. Early relationships as regulators of infant physiology and behavior. *Acta Paediatr Suppl*. 1994. 397, p. 9–19.

HUOT, R. L.; PLOTSKY, P. M.; LENOX, R. H.; McNAMARA, R. K. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res.* 2002. 950: 52-63.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. The biochemistry of memory formation and its regulation by hormones and neuromodulators. *Psychobiology* 1997a. 25(1): 1-9.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol learn mem* 1997b. 68(3): 285-316.

IZQUIERDO, I. Os labirintos da memória. *Ciência Hoje.* 1999. 148: 38-43.

IZQUIERDO, I. Memória. Porto Alegre: Artmed. 2002a.

IZQUIERDO, I. A modulação das memórias: influencia do nível de alerta, do nível de ansiedade e do estado de ânimo. Porto Alegre: Artmed. p. 63-71. 2002b.

IZQUIERDO I.; CAMMAROTA, M. Neuroscience. Zif and survival memory. *Science.* 2004a. 304:829-30.

IZQUIERDO, I. A arte de esquecer: cérebro, memória e esquecimento. Rio de Janeiro: Vieira @ Lent. 2004b.

JOËLS, M.; KARST, H. Hippocampus, corticosteroid effects on. *Encyclopedia of estress*, 1 ed. v.2. p. 372-378. 2007.

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. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002. 73, 131–140.

KAUFMAN, J.; PLOTSKY, P. M.; NEMEROFF, C. B.; CHARNEY, D. S. Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. *Biological Psychiatry.* 2000. v.48, n.8, p.778-790.

KUHLMANN, S.; WOLF, O. T. A non-arousing test situation abolishes the impairing effects of cortisol on delayed memory retrieval in healthy women. *Neurosci Lett* , 2006. v. 399, n. 3, p. 268-72.

KUHN, C. M.; BUTLER, S.R.; SCHANBERG, S. M. Selective depression of serum growth hormone during maternal deprivation in rat pups. *Science*. 1978. 201: 1034-1036.

KUHN, C. M.; EVONIUK, G.; SCHANBERG, S. M. Loss of tissue sensitivity to growth hormone during maternal deprivation in rats. *Life Sciences*. 1979. 25: 2089-2097.

KUHN, C. M.; SCHANBERG, S. M. Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *Int J Dev Neurosci*. 1998. 16, p. 261–270.

LABRADOR, F. J.; CRESPO, M. Evaluación del estrés. In: Fernández-Ballesteros R. Evaluación conductual hoy. Un enfoque para el cambio en psicología clínica y de la salud. Ediciones pirámide S.A – Madrid; 1994. p. 484-529.

LESBURGUÈRES, E.; GOBBO, O. L.; ALAUX-CANTIN, S.; HAMBUCKEN, P. T.; BONTEMPI, B. Early tagging of cortical networks is required for the formation of enduring associative memory. *Science*. 2011. 331: 924 (2010).

LEVINE, S. Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science*. 1957. 126:405.

LEVINE, S. The effects of differential infantile stimulation on emotionality at weaning. *Can J Psychol* 1959. 13: 243-247.

LEVINE, S.; HALTMEYER G. C.; KARAS, G. C.; DENENBERG, V. H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol Behav*. 1967. 2, p. 55-59.

LEVINE, S. The psychoendocrinology of stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993. 29, 697, p. 61-69.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiol Behav* 2001. 73: 255-260.

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 responses to stress. *Science*. 1997. 12, 5332, p.1659-1662.

LIU, D.; DIORIO, J.; DAY, J. C.; FRANCIS, D. D.; MEANEY, M. J. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci* 2000. 3:799–806.

LUCION, A. B. aversive stimulation during the estress-hyporesponsive period does not affect the number of corticotroph cells in neonatal male rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1997. v.30, p. 1463-1466.

LUPIEN, S. J.; MAHEU, F. S. Memory and Stress. *Encyclopedia of stress*. 1 ed. v.2, 2007. P. 721-727.

LUPIEN, S. J.; FIOCCO, A.; WAN, N.; MAHEU, F.; LORD, C.; SCHRAMEK, T.; TU, M. T. Stress hormones and human memory function across the lifespan. *Psychoneuroendocrinology*. 2005. 30:225-242.

MARARIÑOS, A. M.; McEWEN, B. S.; FLÜGGE G.; FUCHS, E. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci* 1996. 16(10): 3534-3540.

MARMENDAL, M. Maternal separation in the rat: long-term effects of early life events on emotionality, drug response and neurobiology. *Dissertação de Doutorado*. Department of Psychology, Göteborg University, Sweden. 2005.

MCCORMICK, C. M.; KEHOE, P.; MALLINSON, K.; CECCHI, L.; FRYE, C. A. Neonatal isolation alters stress hormone and mesolimbic dopamine release in juvenile rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2002.73:77–85.

MCGAUGH J. L, 2000. Memory-a century of consolidadtion. *Science*. 2000. 287: 248-251

MCINTOSH, J.; ANISMAN, H.; MERALI, Z. Short and long periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: genderdependent effects. *Dev Brain Res*. 1999. 113: 97-106.

MEANEY, M. J.; AITKEN, D. H.; SHARMA, S.; VIAU, V.; SARRIEAU, A. Postnatal handling increases hippocampal type II glucocorticoid receptors and enhances adrenocorticoid negative feedback efficacy in the rat. *Neuroendocrinology* 1989. 50: 597-604.

MEANEY, M.J.; BHATNAGAR, S.; LAROCQUE, S.; McCORMICK, C.; HANKS, N.; SHARMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V.; PLOTSKY, P.M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 29, 697, p. 70-85. 1993.

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

MEANEY, M. J.; BRAKE, W.; GRATTON, A.; Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: a neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? *Psychoneuroendocrinology*. 2002. 27 (1-2): 127-138.

MCEWEN B. S. Sex, estress and hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Anging*. 2002. 23: 921-939.

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

MILLER, D. B.; O'CALLAGHAN, J. P. Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism*. 2002. 51, (6), p. 5-10.

OGAWA, T.; MIKUNI, M.; KURODA, Y.; MUNEOKA, K.; MORI, K.J.; TAKAHASHI, K. Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring, potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994. 49, p. 961 – 967.

PFAFF, D. W. et al. Telemetered recording of hormone effects on hippocampal neurons. *Science*. 1971. v. 172, n. 981, p. 394-395.

PICKERING, A. D. The concept of biological stress. In: — *Stress and fish*. New York: Academic Press, 1981. p. 225-255.

PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1993. 18: 195–200.

RHEES, R.; LEPHART, E.; ELIASON, D. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behavioral Brain Research*. v.123. p.1-10, 2001.

ROOZENDAAL, B.; NGUYEN, B. T.; POWER, A. E., McGAUGH, J. L. Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1999. 11642–11647.

ROSENFELD, P.; SUCHECKI, D.; LEVINE, S. Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during developmental. *Neurosci Biobehav Rev*. v. 16. n. 4, p 553-568. 1992.

SANDI, C. Glucocorticoids act on glutamatergic pathways to affect memory processes. *Trend in Neuroscience*. 2011. 812: 1-12.

SAPOLSKY, R. M.; KREY, L. C.; McEWEN, B. S. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *J Neurosci* 1985. 5:1222–1227.

SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids – Adverse Effects on the Nervous System. *Encyclopedia of Stress*. 1 ed. v.2, p. 238-243. 2007.

SCHANBERG, S.M.,; EVONIK, G.; KUHN, C. M. Tactile and nutritional aspects of maternal care: specific regulators of neuroendocrine function and cellular development. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1984. 175: 135-146.

SAPOLSKY, R. M. Stress in the wild. *Scientific American*, v. 262, n.1, p. 106-113. 1990.

SCOTT, J. P. Critical periods in behavioral development. *Science* 138: 949-958. 1962.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, London, v. 138, n. 1, p.32. 1936.

SILVEIRA, P. P.; PORTELLA, A. K.; CLEMENTE, Z.; BASSANI, E.; TABAJARA, A. S.; GAMARO, G. D.; DANTAS, G.; TORRES, I. L.; LUCION, A. B.; DALMAZ, C. Neonatal handling alters feeding behavior adult rats. *Physiol Behav* 2004. 80 (5): 739-745.

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. *Int J Dev Neurosci*. 2005. 23 (1): 93-99.

SQUIRE L. R.; KANDEL, E. R. *Memória: da mente às moléculas*. 1 ed. Porto Alegre, 2003.

STARKMAN, M. N.; GEBARSKI, S. S.; BERENET, S.; SCHTEIGART, D. E. Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. *Biol Psychiatr* 1992. 32(9): 756-765.

SZAPIRO, G.; GALANTE, J. M.; BARROS, D. M.; LEVI DE STEIN, M.; VIANNA, M. R.; IZQUIERDO, L. A.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochem Res*. 2002. 27:1491-1498.

TANNO, A. P.; MARCONDES, F. K. Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 38, n. 3. 2002.

TODESCHIN, A. S.; WINKELMANN-DUARTE, E. C.; JACOB, M. H.; ARANDA B. C.; JACOBS, S.; FERNANDES, M. C.; RIBEIRO, M. F.; SANVITTO, G. L.; LUCION, A. B. Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Horm Behav*. 2009. 56(1):93-100.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*. 53, p. 865-871. 2002.
VIANNA, M. R.; SZAPIRO, G.; McGAUGH, J. L.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001. 98:12251-4.

WALKER, C. D.; PERRIN, M.; VALE, W.; RIVIER, C. Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology*. v. 118. N. 4. P. 1445-1451, 1986.

WEAVER, I. C.; CERVONI, N.; CHAMPAGNE, F. A.; D'ALESSIO, A. C.; SHARMA, S.; SECKL, J. R. et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 2004. 7: 847-854.

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

WOLF, O. T. *Glucocorticoid Effects on Memory: the positive and the negative.* University of Bielefeld, Bielefeld, Germany. 2007. p. 464-469.