ALINE DE MELLO CRUZ

**Modulação opioideérgica na seleção
comportamental após o parto**

**São Paulo
2009**

ALINE DE MELLO CRUZ

Modulação opioideérgica na seleção comportamental após o parto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka

**São Paulo
2009**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2142
FMVZ

Cruz, Aline de Mello

Modulação opioideérgica na seleção comportamental após o parto / Aline de Mello Cruz. – São Paulo : A. M. Cruz, 2009.
78 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka.

1. Opióide. 2. Morfina. 3. Abuso de drogas. 4. Substância cinzenta periaquedutal. 5. Forrageamento. I. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Ficha	4	1	78 f.	77 f.
catalográfica				
RESUMO	1	3	78 f.	77 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Investigação do papel da modulação opioidérgica e endócrina na seleção comportamental após o parto", protocolado sob o nº1192/2007, utilizando 120 (cento e vinte) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/07.

We certify that the Research "The role of opioidergic and endocrine modulation on post partum behavioral selection", protocol number 1192/2007, utilizing 120 (one hundred twenty) rats, under the responsibility Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/07.

São Paulo, 19 de outubro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CRUZ, Aline de Mello

Título: Modulação opioideérgica na seleção comportamental após o parto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular em Neurociências e Comportamento do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo com bolsa de Mestrado concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo número 2006/58263-3).

**Dedico este trabalho a minha querida filha Julia,
que veio a este mundo para eu perceber
que posso ser uma pessoa melhor a cada dia;
que o cérebro, o corpo e a alma de uma mulher
mudam substancialmente depois que ela se torna mãe;
que ser mãe é doar,
sem esperar absolutamente nada em troca;
que o sorriso de um filho
vale mais do que qualquer tesouro ou palavra;
Este trabalho não tem fim.
A investigação será extensa,
até que alguém compreenda exatamente o que se passa
no cérebro de uma mãe**

AGRADECIMENTOS

A Deus, que está ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Cláudio e Jussara, que fizeram o possível e o impossível para que eu me tornasse uma pessoa melhor através da educação e do estudo.

Aos meus irmãos, Giselle e Daniel, que me mostraram o lado bom da infância, e sempre compartilharam comigo seus momentos de felicidade e tristeza, por me mostrarem a cada dia que a amizade leal existe no mundo.

Ao meu marido, Guilherme, por ser co-autor da obra prima da minha vida, nossa filha Julia. Pelo incentivo diário a lutar pelos meus ideais, pela atenção e amor. Por aguentar minhas crises de mau-humor. Pelos momentos de ausência, principalmente aos finais de semana.

À minha querida filha Julia, razão da minha existência, que me ensinou o que é o amor sem limites e verdadeiro.

Aos meus sogros, César e Eliza, que me apóiam e me tratam como sua filha.

Ao meu tio Rick (*in memoriam*), que com certeza estaria orgulhoso de mim, mas obviamente não falaria... Por me fazer entender que a vida deve ser vivida em toda sua intensidade a cada minuto, apesar de eu ainda não ser capaz de seguir este ensinamento.

Ao Prof. Dr. Luciano Freitas Felicio, que me abriu as portas do Departamento de Patologia desta Faculdade, acreditando nos meus sonhos e apoiando a pesquisa. Pela sua amizade e confiança em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka, por gentilmente ter assumido minha orientação na ausência do Prof. Luciano, pela atenção, pela amizade.

Ao Prof. Dr. Newton Sabino Canteras, por acompanhar nossos trabalhos e sempre contribuir com idéias originais e inovadoras.

Aos funcionários do VPT, pela excelente convivência.

Aos funcionários da biblioteca, por serem sempre prestativos, sem medir esforços para nos ajudar, mesmo na última hora...

Aos funcionários do biotério, sempre prestativos e simpáticos, Claudia Mori, Herculano, Mauro, Luís, Nelson, Idalina e Rosiris, agradeço de forma especial.

Ao pessoal do Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan, principalmente à Irene, por fornecer as baratas utilizadas neste experimento de maneira tão gentil. Ao Juliano do biotério central do Instituto Butantan, meu agradecimento especial. À Eliana, do Laboratório de Herpetologia, por ter me apresentado a estas pessoas tão maravilhosas.

A minha querida amiga Gisele Lewartoski, que me auxiliou grandemente no meu início no laboratório e em diversos momentos da pesquisa e na minha vida pessoal, por sua amizade e carinho, por ser uma grande companheira para todas as horas.

A minha querida amiga Marcia Harumi Sukikara, que além de ser um apoio inestimável em momentos profissionais e pessoais, também se mostrou extremamente capacitada como orientadora intelectual, sempre prestativa, pontual e impecável com seu trabalho, meu agradecimento especial.

A amiga Bel, pelas longas discussões de Farmacologia e Estatística, muito proveitosas no meu desenvolvimento profissional.

A todos os colegas da pós-graduação, pela companhia sempre agradável.

Aos meus queridos, Debbie, Pinti, Adelaide, Mel, Floren, Filó, Mia, Frida e Sidoco, pelo amor sem limitações e alegria que sempre me proporcionaram, por me ensinarem no dia-a-dia que o comportamento animal é magnífico, meu agradecimento especial.

A todos os professores do Departamento de Patologia, pelos grandiosos ensinamentos.

A todos os professores da Farmacologia, com quem tanto aprendi durante a realização do Programa de Aperfeiçoamento em Ensino. Que me fizeram confirmar minha paixão pela Farmacologia e pela sala de aula, pelo contato com os alunos... Meu agradecimento especial à Prof. Helenice, por ser um exemplo profissional e pessoal a ser seguido, por sua atenção e carinho, por sua competência e seriedade em tudo o que faz, por tudo o que me ensinou.

Aos queridos animais utilizados neste estudo, sempre muito bem cuidados e respeitados, mas que tiveram suas vidas encurtadas em prol da ciência, meu agradecimento especial.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), instituição de seriedade ímpar, que financiou este estudo através da concessão de bolsa de Mestrado.

A artista Cássia Cristiane Medea, pela elaboração dos desenhos.

A todos que aqui não foram mencionados de forma individual, porém contribuíram de alguma maneira para a realização deste estudo.

“Vejam os animais e os tome como exemplo.
Embora as mães (animais) tenham seus
estômagos rasgados (...)
Embora seus filhotes tenham sido a causa
de todos os seus infortúnios,
seus primeiros cuidados com eles
fazem-nas esquecer tudo o que sofreram (...)
Esquecem-se delas próprias,
pouco preocupadas com sua felicidade (...)
As mulheres, como todos os animais,
também estão sob o domínio deste instinto.”

Jean-Emmanuel Gilibert, 1770
Médico francês

RESUMO

CRUZ, A. M. **Modulação opioidérgica na seleção comportamental após o parto.** [Opioidergic modulation of behavioral selection during lactation]. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O tratamento com morfina ao final da prenhez, faz com que uma única dose dessa droga durante a lactação iniba o comportamento maternal e estimule a caça predatória. A intensidade dessa mudança comportamental depende da dose desafio de morfina utilizada. A exposição a drogas de abuso pode levar a um fenômeno denominado tolerância reversa, que consiste na exacerbação dos efeitos do tratamento agudo com um fármaco observada após a interrupção de um tratamento crônico. O objetivo deste estudo foi avaliar como os efeitos do pré-tratamento com morfina durante a gestação podem influenciar na seleção comportamental após o parto. Ratas foram expostas simultaneamente a filhotes e insetos, sendo observada a expressão dos comportamentos maternal e predatório. As ratas foram tratadas com injeções diárias de morfina (3,5 mg/Kg, s.c.) do 17º ao 21º dia de gestação, e desafiadas agudamente no 5º ou 6º dia de lactação com doses distintas de morfina (0,5, 1,0 e 1,5mg/Kg; grupos MM0,5, MM1,0 e MM1,5) ou salina (grupo MS). Grupos controle foram pré-tratados com salina e desafiados com morfina (0,5, 1,0 e 1,5mg/Kg; grupos SM0,5, SM1,0 e SM1,5) ou salina (grupo SS), respectivamente. Em seguida foram testadas no paradigma de escolha entre cuidar dos filhotes e caçar. Animais pré-tratados com morfina e desafiados com 1,0 mg/Kg tiveram parâmetros de comportamento maternal prejudicados e facilitação ao comportamento de caça de maneira significativa, o que não foi observado nos animais desafiados com a dose de 0,5 mg/Kg. Animais desafiados com 1,5 mg/Kg de morfina tiveram prejuízo em relação ao comportamento maternal e facilitação do comportamento predatório tanto no grupo de fêmeas pré-tratadas com morfina, quanto com salina. Em ratas lactantes a exposição simultânea a filhotes e insetos permitiu revelar a existência de tolerância reversa à mudança comportamental induzida por estímulo opioidérgico.

Palavras-chave: Opióide. Morfina. Abuso de drogas. Substância cinzenta periaquedutal. Forrageamento.

ABSTRACT

CRUZ, A. M. **Opioidergic modulation of behavioral selection during lactation.** [Modulação opioidérgica na seleção comportamental após o parto]. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Treatment of postpartum female rats with morphine inhibits maternal behavior. The same treatment also stimulates foraging in adult animals. Exposure to drugs of abuse may result in a progressive and enduring enhancement of their reinforcing effects. Puerperal treatment with morphine leads to reverse tolerance to this drug, ultimately influencing the effects of opiates on maternal behavior. The aim of the present study was to investigate whether abrupt withdrawal from repeated morphine treatment during late pregnancy may influence the effects of morphine on behavioral selection in lactating rats. Animals were exposed simultaneously to pups and insects, and the choice between taking care of the pups and hunting for insects was observed. Female Wistar rats were treated with morphine (3.5 mg/kg/day, subcutaneous [s.c.]) or saline for 5 days beginning on pregnancy day 17. On day 5 of lactation, animals were acutely challenged with morphine (0.5, 1.0, or 1.5 mg/kg, s.c.; MM0.5, MM1.0, and MM1.5 groups, respectively) or saline (MS group) and simultaneously tested for predatory hunting and maternal behavior. Control groups were pretreated with saline and challenged with morphine (SM0.5, SM1.0, and SM1.5 groups) or saline (SS group). Animals treated with morphine during late pregnancy and acutely challenged with 1.0 mg/kg morphine (MM1.0 group) exhibited significantly decreased maternal behavior and enhanced hunting. This effect was not evident for the 0.5 mg/kg dose. The 1.5 mg/kg morphine dose decreased maternal behavior and increased hunting in both the MM1.5 group and in animals acutely challenged with morphine after previous saline treatment (SM1.5 group). These results provide evidence of plasticity of the opioidergic role in behavioral selection during lactation.

Key words: Opioid. Morphine. Drug abuse. Periaqueductal gray. Foraging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Citologia Vaginal em rata	28
Figura 2	- Dimorfismo sexual em ratos recém nascidos	29
Figura 3	- Delineamento experimental do pré-tratamento	29
Figura 4	- Delineamento experimental para o preparo dos animais	30
Figura 5	- Delineamento experimental para o dia do teste comportamental	30
Figura 6	- Modelo da caixa experimental utilizada no dia do teste comportamental	31
Figura 7	- Seqüência cronológica de eventos do teste comportamental	31
Figura 8	- Parâmetros de comportamento maternal em ratas	32
Figura 9	- Escores de latências	33
Figura 10	- Estrutura química da morfina	34
Figura 11	- Número de contatos com filhotes	42
Figura 12	- Busca do primeiro filhote	43
Figura 13	- Número de vezes em que a rata busca os filhotes	44
Figura 14	- Tempo gasto pela fêmea fazendo <i>grooming</i> nos filhotes	45
Figura 15	- Agrupamento de filhotes	46
Figura 16	- Manifestação do comportamento de agrupar e lambe os filhotes	47
Figura 17	- Agrupar e lambe filhotes (%)	48
Figura 18	- <i>Arched back nursing</i>	49
Figura 19	- <i>Arched back nursing</i> (%)	50
Figura 20	- Percentual de ratas que manifestaram <i>Full maternal behavior</i> (F.M.B.)	51
Figura 21	- Tempo em que a rata permaneceu parada	52
Figura 22	- Tempo em que a rata realizou o comportamento de <i>self grooming</i>	53
Figura 23	- Comportamento exploratório	54
Figura 24	- Número de contatos com insetos	55
Figura 25	- Latência para captura de insetos	56
Figura 26	- Percentual de captura dos cinco insetos	57
Figura 27	- Tempo gasto pela rata comendo insetos	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1	COMPORTAMENTO MATERNAL	17
1.2	OPIÓIDES	19
1.3	COMPORTAMENTO PREDATÓRIO	22
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVOS GERAIS	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	ANIMAIS	27
3.2	ACASALAMENTO E PADRONIZAÇÃO DA NINHADA	27
3.3	PRÉ-TRATAMENTO	29
3.4	HABITUAÇÃO	29
3.5	TESTE COMPORTAMENTAL	30
3.5.1	<i>Parâmetros analisados</i>	32
3.6	DROGAS UTILIZADAS	34
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4	RESULTADOS	35
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICE	77

**"Você não pode voltar atrás
e fazer um novo começo,
mas pode começar agora
e fazer um novo fim."**

(Chico Xavier)

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 COMPORTAMENTO MATERNAL

O comportamento maternal (CM) envolve vários aspectos adaptativos que, criam condições favoráveis para a sobrevivência da prole com um impacto positivo na preservação de determinada espécie.

Esse comportamento pode estar presente em não mamíferos como aves e mesmo répteis. Entretanto, o conhecimento sobre a neurobiologia do CM advém principalmente de estudos feitos com mamíferos, classe na qual os filhotes dependem exclusivamente do leite, aquecimento, proteção e defesa providos pela mãe.

A maneira com que uma mãe satisfaz as necessidades dos filhotes e o modo como estes suscitam as respostas necessárias comprovam a existência de um sistema altamente integrado e desenvolvido em comum. Em várias espécies de mamíferos, logo após o parto a mãe lambe o líquido amniótico e o sangue remanescentes. A frequência deste comportamento de lamber é mais elevada para as regiões do ânus e genital de seus filhotes. A estimulação pelas lambidas da mãe é essencial à micção. Substâncias químicas atrativas na urina dos filhotes parecem recompensar a mãe pelo seu bom desempenho (HRDY, 1999).

O CM, intrigante devido a sua complexidade, é ainda mais flexível em humanos, mas pode ser verificado em vários modelos animais. A espécie mais utilizada para tais estudos é o rato – *Rattus norvegicus* (NUMAN, 1994; STERN, 1997).

A maioria das fêmeas de roedores pode ser condicionada a lamber os filhotes, protegê-los e levá-los ao ninho. Assim que o comportamento se estabelece, a mera presença de filhotes gera a resposta de cuidar deles. Ratas virgens podem vir a cuidar de filhotes em consequência à exposição diária aos mesmos devido a um fenômeno denominado sensibilização comportamental. Isso sugere que as mudanças hormonais ocorridas durante a gravidez, por si só, não são essenciais para o desenvolvimento deste comportamento. Entretanto, quando a fêmea engravida, ela passa a responder mais rápido aos filhotes (NUMAN, 1994).

Em um dos experimentos clássicos nessa área de investigação, o sangue de uma rata que acabara de parir foi injetado em uma fêmea virgem. A transfusão causou uma significativa redução no tempo em que esta rata virgem levou para iniciar os cuidados com os filhotes. As fêmeas que haviam recebido a transfusão sanguínea agruparam todos os filhotes, adotando a posição de amamentação e lambendo a todos, sem diferenças comportamentais em relação mães que haviam acabado de parir (TERKEL; ROSENBLATT, 1968).

Muitas drogas têm sido utilizadas para o estudo das bases neurobiológicas do CM. O uso de drogas de abuso por mulheres grávidas é cada vez mais comum. A negligência materna, déficit na interação entre mãe e filho, prejuízo do desenvolvimento físico e cognitivo do filho prejudicado, uso de entorpecentes e/ou substâncias psicoativas por crianças e adolescentes, podem estar relacionados com o uso dessas drogas (WASSERMAN; LEVENTHAL, 1993). Estudos envolvendo CM e drogas de abuso são importantes para entender o mecanismo de dependência a drogas nas mães e descobrir possíveis tratamentos para síndromes que promovem alterações comportamentais em mães e gestantes.

Aspectos motivacionais estão diretamente associados à manifestação do CM, principalmente durante os primeiros dias da expressão deste comportamento. Em testes de preferência, ratas passam mais tempo com seus filhotes do que local associado à cocaína (MATTSON et al., 2001, 2003). Na primeira semana do período pós-parto ocorre uma redução significativa nos níveis de ansiedade da rata (LONSTEIN, 2005).

Mudanças hormonais que ocorrem no final da gestação e durante a lactação, como a alteração dos níveis de estrógeno, progesterona, prolactina, ocitocina, vasopressina, colecistocinina octapeptídeo (CCK8) e β -endorfina são necessários para o estabelecimento e a expressão desse importante comportamento (SHAIKH, 1971; SANYAL, 1978; THORBURN; CHALLIS, 1979; NUMAN, 1994; FELICIO et al., 1991; MIRANDA-PAIVA; FELICIO, 1999). A injeção de β -endorfina no ventrículo lateral de ratas lactantes inibe o CM de maneira dose dependente, sugerindo que alterações nos níveis de opióides endógenos alteram a resposta da mãe aos seus filhotes (FELICIO et al., 1991; MANN et al., 1995).

Apesar do CM depender de vários outros fatores, tais como, fatores ambientais e neuroquímicos, mudanças hormonais são essenciais para que ocorra o início do CM, logo ao nascimento dos filhotes, (NUMAN, 1994). O padrão de

alteração do perfil hormonal, com queda nas concentrações de progesterona e aumento nas de estrógeno e prolactina ao final da gestação é fundamental para a expressão do CM (MOLTZ et al. 1970).

À medida que os filhotes crescem e vão se tornando independentes, capazes de se auto-regular termicamente e de se alimentar, a mãe torna-se também menos responsiva em relação aos filhotes. Estudos mostram que, em ratas, ocorrem variações naturais no cuidado maternal que alteram permanentemente o comportamento e a regulação química dos filhotes, como lambar a região urogenital dos mesmos (FRANCIS et al., 2002; BREDY et al., 2003). O ato da mãe lambar a região anogenital dos filhotes é um mecanismo que favorece ambas as partes envolvidas. Um estudo publicado por Friedman e Bruno (1976) mostrou que a rata mãe é uma das fontes de reciclagem de água mais perfeitas da natureza. Foi calculado que a rata lactante durante os primeiros dez dias de lactação consome 21mL de água proveniente da urina de seus filhotes, e produz 35mL de leite, ou seja, quase 2/3 da água do leite é proveniente deste processo. Este leite, além de fonte de vitaminas, calorias e gordura, possui anticorpos extremamente específicos aos seus filhotes.

1.2 OPIÓIDES

O termo opióide aplica-se a qualquer substância endógena ou sintética que produza efeitos semelhantes ao da morfina, e que sejam bloqueados por seus antagonistas, como a naloxona. Opiáceo é um termo mais antigo, restrito apenas aos derivados sintéticos. O ópio é o extrato do suco da papoula *Papaver somniferum*, e tem sido utilizado com finalidades sociais e medicinais há milhares de anos. O ópio contém muitos alcalóides relacionados à morfina. A morfina foi o primeiro dos alcalóides vegetais a ser isolado. Foi cristalizada do ópio bruto por Sertürner em 1805. O sulfato de morfina USP é o principal sal da morfina. Em 1905 a estrutura da morfina foi determinada, e iniciaram as descrições sobre seus principais efeitos farmacológicos, tais como, analgesia, euforia, sedação, depressão respiratória, supressão da tosse, náusea, vômito, miose, constipação, liberação de histamina, entre outros. Os diferentes efeitos da morfina se devem à interação com os receptores específicos (μ , κ , δ). Sabe-se que a expressão de tais receptores está diretamente envolvida com a seleção comportamental durante a lactação,

modulando de forma direta e indireta os fenômenos neuroendócrinos que ocorrem neste período (SUKIKARA et al., 2006; TEODOROV et al., 2007, 2008).

Opióides endógenos existem em todas as espécies de vertebrados e em muitas espécies de invertebrados (OLSON et al. 1981). Foram descritas três famílias de opióides endógenos: β endorfina, encefalinas e dinorfina.

A morfina, bem como peptídeos opióides endógenos, exerce seus efeitos farmacológicos por meio de ligação com receptores endógenos. Agonistas opióides representam um grupo de substâncias naturais, semi-sintéticas ou sintéticas, que agudamente induzem analgesia, depressão respiratória, miose, constipação, sensação de bem estar, entre outras ações (BODNAR; HADJIMARKOU, 2002). Entretanto, quando utilizados cronicamente, estes fármacos podem induzir tolerância ou sensibilização comportamental, que também é chamada de tolerância reversa. Nestes fenômenos os efeitos conhecidos decorrentes do tratamento agudo com o fármaco são alterados ao longo e após o tratamento prolongado (MOLLEREAU et al., 1994; WHISTLER et al., 1999; KORNETSKY, 2004).

Os opióides estimulam o apetite e inibem o CM de ratas durante a lactação (BRIDGES; GRIMM, 1982; FELICIO et al., 1991).

Os testes comportamentais que avaliam a atividade locomotora de roedores têm sido úteis para analisar o fenômeno de sensibilização comportamental pela morfina (DEROCHE et al., 1992; SPANAGEL, 1995). Assim, a existência da sensibilização aos opióides tem sido revelada experimentalmente, pelo menos em áreas cerebrais importantes para a função motora. Portanto, tanto a tolerância observada para as ações inibitórias dos opióides, principalmente a analgesia, como a sensibilização para os seus efeitos excitatórios, como a locomoção, encontram-se inseridas no contexto da plasticidade neuronal (CRAIN; SHEN, 1998; ERDTMANN-VOUR et al., 1998; MEUSER et al., 2003). Entretanto, estudo recente de Deak et al. (2009), demonstrou que a dose de 1,0mg/Kg de morfina diminui a investigação social em roedores, e que machos e fêmeas respondem de formas distintas ao fenômeno de tolerância.

O fenômeno de tolerância reversa pode ser definido como um aumento no efeito comportamental de uma droga quando da sua administração após um tratamento prolongado, seguido de um período de abstinência. Foi caracterizada em 1932, quando efeitos psicomotores de anfetamina foram estudados em animais de laboratório (DOWNS; EDDY, 1932). Em 1958 esse fenômeno foi registrado em

humanos em relação aos efeitos psicóticos de anfetamina, a qual induz uma síndrome indistinguível da esquizofrenia paranóica (CONNELL, 1958). Em outras situações, uma droga pode tornar-se cada vez mais efetiva, fenômeno conhecido como sensibilização. Tolerância e sensibilização ocorrem principalmente em drogas de abuso. A sensibilização é na verdade exatamente o oposto da tolerância, ou seja, doses repetidas de uma droga produzem efeitos cada vez maiores. A existência da sensibilização aos opióides tem sido revelada experimentalmente, pelo menos em áreas cerebrais importantes para a função motora. Portanto, tanto a tolerância observada para as ações inibitórias dos opióides, principalmente a analgesia, como a sensibilização para os seus efeitos excitatórios, como a locomoção, encontram-se inseridas no contexto da plasticidade neuronal (CRAIN; SHEN, 1998; ERDTMANN-VOULIOTIS et al., 1998; FELICIO et al., 2001; MEUSER et al., 2003).

Doses não sedativas de morfina inibem o CM, ao passo que seu antagonista farmacológico naloxona restabelece a resposta materna das fêmeas lactantes em relação a sua prole (BRIDGES; GRIMM, 1982; MIRANDA-PAIVA et al., 2001; SUKIKARA et al., 2007; FELICIO; CANTERAS, 2008).

Em estudos de tolerância reversa com ratas lactantes, nossa equipe e outros autores demonstraram que o CM pode ser inibido por baixas doses de morfina durante a gestação, porém isso não ocorre quando a morfina é aplicada antes do início do período gestacional. Fêmeas testadas exclusivamente com filhotes e desafiadas de forma aguda com 5,0 mg/Kg de morfina tiveram o CM inibido. A dose de 3,0 mg/Kg não foi suficiente para inibir estes parâmetros, exceto em ratas que tiveram estimulação opioidérgica no final da lactação. (MIRANDA-PAIVA et al., 2001, 2003, 2007; SLAMBEROVÁ et al., 2001; YIM et al., 2006;).

1.3 COMPORTAMENTO PREDATÓRIO

O padrão de ativação da substância cinzenta periaquedutal (PAG) durante a inibição opioidérgica do CM apresenta grande similaridade àquele observado durante o forrageamento em roedores (COMOLI et al., 2003; MIRANDA-PAIVA et al., 2003).

Os animais que foram tratados e desafiados com sulfato de morfina, apresentaram seu CM inibido, favorecendo então a expressão de um outro comportamento mais premente e de maior valor adaptativo naquele momento, ir à procura de alimento. Foi demonstrado que o mesmo setor da PAG mobilizado durante a inibição opioide do CM, também se apresenta igualmente mobilizado em animais que estavam forrageando. No paradigma de preferência por filhotes ou insetos, animais tratados e desafiados com morfina, capturaram insetos com mais voracidade do que os animais tratados e desafiados com solução salina, que na grande maioria preferem cuidar de sua prole (SUKIKARA et al., 2006).

Dados da literatura mostram que a PAG ocupa uma posição estratégica no SNC, uma vez que integra informações corticais, oriundas do córtex pré-frontal e informações límbicas e influencia a expressão de diversos comportamentos motivados, como os comportamentos de defesa e maternal (SUKIKARA et al., 2006). Além disso, resultados obtidos em nosso laboratório demonstraram que a morfina estimula o forrageamento também em ratas lactantes que não foram pré-tratadas, sugerindo que a existência de opióides endógenos pode ser capaz de estimular a caça predatória em ratas lactantes (SUKIKARA et al., 2007).

Em recente trabalho, Mota-Ortiz et al. (2009), demonstraram que a porção rotolateral da PAG (PAGrl) pode estar envolvida na modulação da busca alimentar, podendo ser informada das condições de hidratação e alimentação, bem como de outras condições viscerais, para que o animal possa comutar da atividade de cuidado da prole para a procura de alimento ou água.

Assim como o processo de seleção natural favorece os animais reprodutivamente competentes, também irá favorecer aqueles que cuidam adequadamente de seus filhotes e sabem o equilíbrio do uso de tempo entre cuidados maternos e atividades que envolvam sua própria sobrevivência.

O presente estudo foi concebido para testar a hipótese de trabalho de que a administração de doses repetidas de morfina ao final da gestação com desafio farmacológico no início da lactação modula o paradigma de caçar *versus* cuidar dos filhotes. Essa hipótese está embasada em publicações prévias do grupo no preceito de que um dado comportamento pode ser inibido para favorecer a ocorrência de uma outra resposta mais adequada e adaptativa para aquele momento.

**"A resposta certa, não importa
nada: o essencial é que as
perguntas estejam certas."
(Mário Quintana)**

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar como a estimulação opioide aguda ou prolongada modula a expressão dos comportamentos de cuidar da prole ou caçar insetos em ratas lactantes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ☞ Verificar como a estimulação opioide aguda modula a seleção entre comportamento maternal e caça predatória em ratas lactantes.
- ☞ Observar a influência do estímulo opioide dos dias 17 a 21 de gestação na indução da mudança do comportamento maternal para o comportamento predatório induzido agudamente pela morfina em ratas lactantes.

**"O primeiro dever da inteligência
é desconfiar dela mesma."
(Albert Einstein)**

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Este estudo está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, tendo sido protocolado sob o nº 1192/2007.

Foram utilizados como sujeitos experimentais ratas (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar virgens, com aproximadamente noventa dias de idade, obtidas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno medindo 30X40X18 cm, em salas com sistema de ventilação ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz de 12 h claro e escuro, (06h00 – 18h00). Água e comida foram fornecidas *ad libitum* durante todos os experimentos. Todos os esforços foram feitos para reduzir o sofrimento e o número de animais utilizados.

Foram utilizados quinze machos e oitenta e cinco fêmeas.

3.2 ACASALAMENTO E PADRONIZAÇÃO DA NINHADA

No final do período claro do dia, ratas que se encontravam no período de transição da fase proestro para estro, foram colocadas na gaiola de um macho sexualmente experiente para o acasalamento, seguindo a proporção de duas fêmeas para cada macho. Logo no início do período claro do dia seguinte foi realizada a análise de citologia vaginal para confirmar a presença de espermatozóides (Figura 1), considerando este o dia um da prenhez.

Figura 1- Citologia vaginal em rata. A) Nota-se a presença de vários espermatozoides no campo, indicando prenhez. B) Espermatozóide de rato, mostrando as porções da cabeça (a), peça intermediária (b) e cauda (c), importantes na avaliação da motilidade e viabilidade

As ratas foram mantidas individualmente até o momento do parto. As ocorrências de nascimentos foram monitoradas diariamente até as 14h00. Após este horário, os partos foram considerados como tendo ocorrido no dia seguinte (dia zero de lactação). No primeiro dia pós-parto (dia um) não foi realizada nenhuma manipulação das mães e seus filhotes, visto que qualquer alteração ambiental e/ou comportamental poderia induzir ao estresse e conseqüentemente, rejeição materna ou mesmo infanticídio da prole.

No dia dois pós-parto, foram realizadas a contagem e padronização dos filhotes, de modo que permaneceram quatro machos e quatro fêmeas por mãe, sempre que possível. A diferença entre gêneros foi verificada por meio da distância anogenital, que é maior nos machos (Figura 2). Mães que tiveram menos de oito filhotes, receberam filhotes doados de mães que tiveram mais do que oito filhotes. As trocas de filhotes ocorreram sempre dentro do mesmo grupo experimental.

media.wiley.com/.../tx1608-fig-0001-1-full.gif

Figura 2 - Dimorfismo sexual em ratos recém nascidos.
Observa-se a maior distância anogenital no macho (Male AGD) quando comparado à fêmea (Female AGD)

3.3 PRÉ-TRATAMENTO

Do 17^o ao 21^o dias de gestação, as ratas receberam pré-tratamentos com solução salina 0,9% ou sulfato de morfina (Cristália®; 3,5mg/kg/dia, S.C.), conforme demonstrado na figura 3.

Figura 3 - Delineamento experimental do pré-tratamento

3.4 HABITUAÇÃO

Com a finalidade de promover a habituação do animal ao aparato experimental, nos dias três e quatro de lactação, as mães foram submetidas à manipulação simulando todo o processo a ser realizado no dia do teste comportamental, sem a presença de filhotes e insetos (Figura 4). Este procedimento torna-se essencial, uma vez que o teste não é realizado na gaiola

moradia, e sim em uma caixa de acrílico especialmente projetada para tal fim. O tempo de habituação foi igual ao tempo de observação no dia do teste.

Figura 4 - Delineamento experimental para o preparo de animais

3.5 TESTE COMPORTAMENTAL

Os testes comportamentais foram realizados nos dias cinco ou seis de lactação, período no qual o CM ocorre em sua intensidade máxima (Figura 5). As mães foram privadas de comida e de seus filhotes uma hora antes do início do teste comportamental. Após trinta minutos as mães receberam uma injeção de sulfato de morfina ou solução salina. O teste comportamental iniciou aos sessenta minutos após a separação dos filhotes e trinta minutos após a dose desafio da solução salina ou morfina. As observações e filmagens comportamentais foram realizadas durante o período de trinta minutos consecutivos (1800s), tempo em que a rata permaneceu no aparato experimental específico confeccionado em acrílico (Figura 6).

Figura 5 - Delineamento experimental para o dia do teste comportamental

Para iniciar o teste comportamental, todos os oito filhotes juntamente com cinco baratas (*Periplaneta americana*) íntegras e vivas, foram introduzidos em uma caixa experimental, na qual a rata já se encontrava. As observações comportamentais e filmagens foram realizadas durante trinta minutos consecutivos (1800 s), para posterior análise comportamental (Figura 7).

Figura 6 - Modelo (A) e caixa experimental em acrílico (B) utilizada no dia do teste comportamental

Figura 7 - Sequência cronológica de eventos do teste comportamental

3.5.1 Parâmetros analisados

Todos os testes comportamentais foram filmados em mídia digital através de câmera filmadora Sony Mini DV, e posteriormente transformados em mídia VCD.

Os parâmetros do comportamento maternal e predatório foram analisados com o auxílio do programa de análises comportamentais Etholog 2.2 (OTTONI, 2000). Exemplos de CM são demonstrados na figura 8. Foram analisados em dois momentos distintos, isto é, do início do teste até os primeiros quinze minutos (900s), e de quinze minutos até trinta minutos (900 a 1800s).

(A) Agrupamento de filhotes; B) Preparo para a postura de amamentação; (C) *Crouching* ou cifose fisiológica; D) *Full maternal behavior* (STERN et al., 2002).

Figura 8 - Parâmetros de CM em ratas

Os parâmetros analisados foram:

- Comportamento exploratório.
- Agrupar e lambar filhotes.
- *Arched back nursing*.
- Tempo em que o animal permaneceu parado.
- Número de contatos com a barata.
- Número de contatos com o filhote.
- Número de vezes em que a mãe capturou os filhotes.
- Latência para captura do primeiro filhote.

- Tempo em que a rata permaneceu comendo baratas.
- Tempo em que a rata permaneceu fazendo *self grooming* antes de comer baratas.
- Tempo em que a rata permaneceu fazendo *self grooming* após comer baratas.
- Tempo em que a rata permaneceu fazendo *grooming* nos filhotes antes de comer baratas.
- Tempo em que a rata permaneceu fazendo *grooming* nos filhotes após comer baratas.
- Agrupamento parcial de cinco filhotes (mais de 50% da ninhada).
- Agrupamento total dos oito filhotes.
- Tempo em que a rata permaneceu na posição de *Arched back nursing*.
- Manifestação do Comportamento Maternal Total (*Full Maternal Behavior – FMB*), que é estabelecido quando a rata permanece na posição de cifose fisiológica durante um período maior ou igual a 3 minutos consecutivos.
- Latências para capturar a primeira, segunda, terceira, quarta e quinta baratas, bem como da primeira à quinta barata.

Para avaliação de alguns parâmetros comportamentais, utilizou-se a seguinte escala de escores que tem por base a latência para iniciar determinado comportamento, conforme observa-se na figura 9 abaixo:

Tempo de teste	Escore
0 a 300 s	1
301 a 600 s	2
601 a 900 s	3
901 a 1200 s	4
1201 a 1500 s	5
1501 a 1800 s	6
Não ocorrência do comportamento durante os 1800 s	7

Figura 9 – Escores de latências

3.6 DROGAS UTILIZADAS

Sulfato de morfina: Laboratório Cristália S/A® São Paulo-SP

Peso molecular: 320,84 (Figura 9)

Solução salina 0,9%

Figura 10 - Estrutura química da morfina.
As duplas ligações entre moléculas de carbono encontram-se em negrito.

A morfina foi preparada em solução que permitiu injetar um volume de 1 ml/kg de peso corporal. As ratas do grupo controle foram administradas com solução salina 0,9% em volume igual àquele injetado nos animais experimentais.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foram utilizados os *softwares* “*GraphPad Instat*” e “*Prisma*”.

Foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida pelo Teste U de Mann-Whitney. O teste de Fisher foi usado para a comparação do percentual de animais que apresentaram o comportamento maternal e/ou predatório. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes sempre que $p < 0,05$ e consideradas como tendências quando $0,05 < p < 0,1$.

"Comece fazendo o necessário,
e depois o que é possível,
e de repente...
Você estará fazendo o impossível!"
(São Francisco de Assis)

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Nas doses de 0,5 mg/Kg e 1,0 mg/Kg, houve um aumento no número de contatos com os filhotes de fêmeas do grupo MM. Durante os primeiros 15 minutos de teste, ratas do grupo MM0,5 contactaram mais seus filhotes, quando comparadas às ratas dos grupos SM0,5 e SS (Figura 11A: KW = 8,406; $U = 19,0$, $p = 0,037$, e $U = 14,5$, $p = 0,008$, respectivamente). Nota-se a mesma diferença quando o tempo total de teste é considerado (Figura 11C: KW = 8,603; MM0,5 X SM0,5, $U = 15,5$, $p = 0,018$; MM0,5 X SS, $U = 14,0$, $p = 0,007$). Durante os 15 minutos finais de teste, o grupo MM1,0 contactou mais com seus filhotes quando comparado aos grupos SM1,0 e SS (Figura 11E: KW = 8,762; $U = 19,0$, $p = 0,007$, e $U = 27,0$, $p = 0,030$, respectivamente). Ao analisar o tempo total de teste, o grupo MM1,0 novamente se sobressai como o grupo com maior número de contatos com seus filhotes. Ainda em relação ao tempo total de teste, observa-se que o grupo MS teve mais contatos com seus filhotes quando comparado ao grupo SM1,0 (Figura 11F: KW = 10,181; MM1,0 X SM1,0, $U = 18,0$, $p = 0,017$; MM1,0 X SS, $U = 17,0$, $p = 0,011$; SM1,0 X MS, $U = 20,5$, $p = 0,028$). Em relação aos grupos desafiados com a dose de 1,5 mg/Kg, não houve diferenças estatisticamente significantes quando comparados entre si e entre os grupos SS e MS (Figuras 10G, H e I).

Utilizando-se a dose desafio de 1,5 mg/Kg, ambos os grupos MM1,5 e SM1,5 apresentaram latências maiores para buscar o primeiro filhote quando comparados ao grupo MS (Figura 12C: KW = 7,663; MM1,5 X MS, $U = 22,5$, $p = 0,038$; SM1,5 X MS, $U = 23,0$, $p = 0,049$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa pode ser observada na comparação das doses desafio menores.

Em relação ao número de buscas de filhotes realizadas pelas mães, apenas a dose desafio de 1,5mg/Kg de morfina no tempo total de teste foi suficiente para promover um menor número de busca de filhotes do grupo MM1,5 quando comparado ao grupo SS (Figura 13I: KW = 7,663; $U = 22,0$, $p = 0,035$). Um fato interessante de observar, entretanto, é que quando observamos as figuras representativas do tempo total de teste (Figura 13C, F e I), podemos notar nitidamente que nos grupos MMs ocorre um decréscimo no número de buscas dose-dependente.

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada comparando-se os grupos em relação ao comportamento de *grooming* dos filhotes antes e após a fêmea comer insetos nas diferentes doses desafio de morfina testadas, conforme demonstra a figura 14.

O agrupamento de filhotes é um importante parâmetro de CM, e através da figura 15, pode-se observar o quão foi prejudicado de maneira dose dependente, principalmente quando se avalia o agrupamento de toda a ninhada, ou seja, dos oito filhotes. Através das figuras 15A, C e E, nota-se um decréscimo gradativo no agrupamento de cinco filhotes (50% da ninhada + um filhote) nos grupos SMs e MMs, quando comparados ao grupo controle SS. Apesar da diferença não ser estatisticamente significativa, nas figuras 15A e C, observa-se que ao aumentar a dose do desafio agudo, os grupos SMs e MMs apresentam este parâmetro comportamental prejudicado (Figura 15A: SS = 50%; SM0,5 = 44,4%; MS = 30%; MM0,5 = 20% e Fig. 14C: SS = 50%; SM1,0 = 40%; MS = 30%; MM1,0 = 30%). Já na figura 15E, o grupo MM1,5 apresentou diferença estatisticamente significativa ao ser comparado com o grupo SS (Figura 15E: $p = 0,0325$; SS = 50%; SM1,5 = 20%; MS = 30%; MM1,5 = 0%). Em relação ao agrupamento de todos os oito filhotes, o fenômeno dose-resposta é demonstrado de maneira mais consistente através das figuras 15B, D e F. Na figura 15D, o grupo MM1,0 diferenciou-se de maneira estatisticamente significativa ao ser comparado com o grupo SS (Figura 15D: $p = 0,010$; SS = 60%; SM1,0 = 40%; MS = 10%; MM1,0 = 0%). Já através da figura 15F, observa-se ainda a diferença estatisticamente significativa dos grupos SM1,5 e MM1,5 em relação ao grupo SS, bem como de MS em relação a SS (Figura 15F: SM1,5 X SS e MM1,5 X SS, $p = 0,010$ e MS X SS $p = 0,049$; SS = 60%; SM1,5 = 0%; MS = 10%; MM1,5 = 0%).

Os grupos que foram pré-tratados cronicamente, MM0,5, MM1,0 e MM1,5, gastaram menos tempo agrupando e lambendo seus filhotes. Esta mudança comportamental pode ser observada durante os primeiros 15 minutos de teste e dos 15 aos 30 minutos (Figura 16A: dose de 0,5mg/Kg de morfina, KW = 9,109; Figura 16D: dose de 1,0mg/Kg de morfina, KW = 11,156; Figura 16G: dose de 1,5mg/Kg de morfina, KW = 10,827; Figura 16B: dose de 0,5mg/Kg de morfina, KW = 10,240; Figura 16E: dose de 1,0mg/Kg de morfina, KW = 13,652; Figura 16H: dose de 1,5mg/Kg de morfina, KW = 12,519). Os três grupos MMs ainda tiveram os percentuais deste comportamento reduzido. Ao comparar o grupo MM0,5 com o

grupo SS, o comportamento de agrupar e lambar os filhotes esteve reduzido durante os primeiros 15 minutos, dos 15 aos 30 minutos, no tempo total de teste e em relação ao percentual de fêmeas que realizaram este comportamento em sua ninhada, conforme demonstram as figuras 16A, B, C e 17A. Fêmeas do grupo MS gastaram menos tempo agrupando e lambendo seus filhotes quando comparadas àquelas do grupo SS, durante os primeiros 15 minutos e tempo total de teste (Figura 16A, D e G: $U = 22,0$, $p = 0,035$; Figura 16C, F e I: $U = 19,0$, $p = 0,036$). O grupo MM0,5 permaneceu menos tempo agrupando e lambendo seus filhotes do que o grupo SM0,5 durante a segunda metade do teste comportamental, dos 15 aos 30 minutos, e durante o tempo total de teste (Figura 16B: $U = 19,5$, $p = 0,039$; Figura 16C: $U = 19,0$, $p = 0,036$). O grupo MM0,5 apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo SS, gastando menos tempo agrupando e lambendo seus filhotes na primeira e segunda metade do teste, bem como durante o tempo total (Figura 16A: $U = 20,0$, $p = 0,024$; Figura 16B: $U = 16,5$, $p = 0,012$; Figura 16C: $U = 16,5$, $p = 0,012$). O percentual de ratas do grupo MM0,5 que apresentaram o comportamento de agrupar e lambar seus filhotes durante o teste comportamental foi menor quando comparado aos grupos SS e SM0,5 (Figura 17A: $p = 0,020$, Teste de Fisher). Para a dose desafio de 1,0mg/Kg, fêmeas do grupo MM1,0 utilizaram menos tempo agrupando e lambendo filhotes em relação ao grupo SS, durante os primeiros 15 minutos, de 15 a 30 minutos e no tempo total de teste (Figura 16D: $U = 20,0$, $p = 0,024$; Figura 16E: $U = 15,0$, $p = 0,008$). O percentual de ratas do grupo MM1,0 que manifestaram este comportamento foi menor quando comparado aos grupos SS e SM1,0 (Figura 17B: $p = 0,003$, Teste de Fischer). Ao utilizar a dose desafio de 1,5mg/Kg, ratas do grupo MM1,5, quando comparadas ao grupo SS, ficaram menos tempo agrupando e lambendo seus filhotes durante os três períodos de teste analisados (Figura 16G: $U = 20,0$, $p = 0,024$; Figura 16H: $U = 23,5$, $p = 0,047$; Figura 16I: $U = 20,5$, $p = 0,027$). Em relação ao percentual de fêmeas que apresentaram este parâmetro, os grupos MM1,5 e SM1,5 tiveram um menor percentual de ratas realizando este comportamento quando comparados ao grupo SS (Figura 17C: MM1,5 X SS, $p = 0,003$; SM1,5 X SS, $p = 0,020$, Teste de Fisher).

O grupo MM0,5 apresentou uma redução no percentual de animais que apresentaram *arched back nursing* quando comparado ao grupo SM0,5 (Figura 19A: $p = 0,006$, Teste de Fisher). Ao comparar o grupo MM1,0 com o grupo MS, observa-se uma redução estatisticamente significativa no tempo em que as ratas do primeiro

grupo tiveram em relação a este comportamento durante o segundo período de análise comportamental (Figura 18E: $U = 20,0$, $p = 0,024$). O percentual de ratas que manifestaram o comportamento de *arched back nursing* esteve reduzido de maneira estatisticamente significativa quando comparado aos grupos SS e MS (Figura 19B: $p = 0,033$, Teste de Fisher). O tempo gasto em *arched back nursing* esteve reduzido no grupo MM1,5 na segunda metade do teste comportamental, quando comparado ao grupo MS (Figura 18H: $U = 20,0$, $p = 0,024$). Em relação ao percentual de fêmeas que manifestaram este comportamento, o grupo MM1,5 teve menos representantes quando comparado aos grupos SS e MS (Figura 19C: $p = 0,033$, Teste de Fisher).

Em relação ao percentual de fêmeas que apresentaram o comportamento maternal total (*Full Maternal Behavior*), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas três doses desafio testadas durante o tempo total de teste, avaliados segundo o Teste de Fisher, conforme observado na figura 20A, B e C.

Na avaliação estatística do tempo em que os animais permaneceram parados (Figura 21), sem manifestar qualquer tipo de comportamento, não foi observado nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, nas três doses desafio utilizadas para este estudo.

O comportamento de *self grooming* foi analisado durante o teste comportamental separadamente, conforme demonstra a figura 22. Avaliou-se este parâmetro antes e após as fêmeas comerem insetos, e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as doses desafio utilizadas.

O grupo MM1,0 apresentou um aumento estatisticamente significativo no tempo de exploração da caixa experimental durante os três momentos de teste analisados, quando comparado aos grupos MS e SM1,0 (Figura 23E: KW = 9,796; MM1,0 X MS, $U = 13,0$, $p = 0,004$; MM1,0 X SS, $U = 21,0$, $p = 0,029$; Figura 23F: KW = 10,628, MM1,0 X MS, $U = 11,5$, $p = 0,004$; MM1,0 X SM1,0, $U = 19,0$, $p = 0,019$; MM1,0 X SS, $U = 22,0$, $p = 0,036$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para o comportamento exploratório em resposta às doses desafio de 0,5mg/Kg (Figura 23A, B e C) e 1,5mg/Kg (Figura 20G, H e I).

Fêmeas desafiadas com a dose de 1,0mg/Kg de morfina agudamente (grupo SM1,0) apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas aos grupos MS e MM1,0 no número de contatos com insetos durante os primeiros 15 minutos do teste comportamental (Figura 24D: KW = 9,330, $p = 0,025$; SM1,0 X MS,

$U = 12,0$, $p = 0,004$; SM1,0 X MM1,0, $U = 17,5$, $p = 0,015$). Nenhuma outra diferença estatisticamente significativa foi encontrada nos outros blocos de tempo analisados, bem como, nas doses desafio de 0,5mg/Kg (Figura 24A, B e C) e 1,5mg/Kg (Figura 24G, H e I).

Quando se observa a figura 25A, D e G, verifica-se que as três doses desafio utilizadas neste estudo não foram capazes de interferir na latência para captura da 1ª barata. Em relação à captura da 5ª barata, apenas a dose de 1,5mg/Kg de morfina se mostrou capaz de alterar de maneira estatisticamente significativa as latências de captura do último inseto presente na caixa experimental. O grupo SM1,5 diferenciou-se de maneira estatisticamente significativa em relação aos grupos SS e MS, e o grupo MM1,5 em relação ao grupo SS (Figura 25H: KW = 12,442; SM1,5 X SS, $U = 15,0$, $p = 0,008$; SM1,5 X MS, $U = 21,0$, $p = 0,029$; MM1,5 X SS, $U = 21,5$, $p = 0,032$). Para as latências de captura do 1º ao 5º inseto, a dose de 1,5mg/Kg foi suficiente para que o grupo SM1,5 manifestasse menores escores quando comparado aos grupos MS e SS (Figura 25I: KW = 8,541; SM1,5 X SS, $U = 23,0$, $p = 0,044$; SM1,5 X MS, $U = 22,5$, $p = 0,040$). É importante salientar que o grupo MM1,5 mostra uma tendência à diferenciação em relação aos grupos SS ($U = 25,5$, $p = 0,066$) e MS ($U = 24,5$, $p = 0,057$).

Em relação ao percentual de ratas que capturaram os cinco insetos durante o período total de teste comportamental, não houve diferença estatisticamente significativa em relação à dose de 0,5mg/Kg de morfina (Figura 26A). A dose de 1,0mg/Kg de morfina promoveu um aumento de caça de todos os insetos no grupo MM1,0 quando comparado ao grupo SS (Figura 26B: $p = 0,05$; SS = 10%, MM1,0 = 60%, Teste de Fisher). Na dose de 1,5mg/Kg, os grupos MM1,5 e SM1,5 tiveram um aumento no percentual de fêmeas que caçaram todos os cinco insetos quando comparados ao grupo SS (Figura 26C: SS = 10%, MM1,5 = 60%, SM1,5 = 40%; MM1,5 X SS, $p = 0,020$; SM1,5 X SS, $p = 0,006$, Teste de Fisher). O grupo SM1,5 apresentou ainda diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo MS (Figura 26C: $p = 0,006$; MS = 20%, Teste de Fisher).

Na análise do tempo em que as fêmeas permaneceram comendo insetos durante o teste experimental (Figura 27), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação às três doses desafio de morfina utilizadas no presente estudo.

Animais pré-tratados com 3.5mg/Kg de morfina ou solução salina ao final da gestação, e testados agudamente com doses desafios de 0,5; 1,0 e 1,5 mg/Kg de morfina.

Número de contatos que as fêmeas efetuaram com seus filhotes durante os primeiros 15 minutos (900s) de teste, **(A)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(D)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(G)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg. Número de contatos que as fêmeas efetuaram com seus filhotes de 15 a 30 minutos (900-1800s) de teste, **(B)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(E)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(H)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. Número de contatos que as fêmeas efetuaram com seus filhotes durante o tempo total de teste (1800s) de teste, **(C)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg, **(F)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(I)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Análise de Variância (ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida pelo Teste U de Mann-Whitney. Grupos experimentais: SS, $n=10$; SM0,5, $n=9$; SM1,0, $n=10$; SM1,5, $n=10$; MS, $n=10$; MM0,5, $n=10$; MM1,0, $n=10$; MM1,5, $n=10$

Figura 11 – Número de contatos com filhotes

Animais pré-tratados com 3.5mg/Kg de morfina ou solução salina ao final da gestação, e testados agudamente com doses desafios de 0,5; 1,0 e 1,5 mg/Kg de morfina.

Latência para a busca do 1º filhote durante o tempo total de teste, expressos em escores de latências para análise estatística adequada (1, 0-300s; 2, 301-600s; 3, 601-900s; 4, 901-1200s; 5, 1201-1500s; 6, 1501-1800s; 7, >1800s), **(A)** ratas desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg, **(B)** ratas desafiadas agudamente com 1,0mg/Kg de morfina e **(C)** ratas desafiadas com 1,5mg/Kg de morfina (* $p < 0,05$).

Análise de Variância (ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida pelo Teste U de Mann-Whitney. Grupos experimentais: SS, n=10; SM0,5, n=9; SM1,0, n=10; SM1,5, n=10; MS, n=10; MM0,5, n=10; MM1,0, n=10; MM1,5, n=10

Figura 12 – Busca do primeiro filhote

Animais pré-tratados com 3.5mg/Kg de morfina ao final da gestação, e testados agudamente com doses desafios de 0.5, 1.0 e 1.5 mg/Kg de morfina.

Número de vezes em que as fêmeas efetuaram busca dos filhotes para agrupamento durante os primeiros 15 minutos (900s) de teste, **(A)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(D)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(G)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg. Número de vezes em que as fêmeas efetuaram busca dos filhotes para agrupamento de 15 a 30 minutos (900-1800s) de teste, **(B)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(E)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(H)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. Número de vezes em que as fêmeas efetuaram busca dos filhotes para agrupamento durante o tempo total de teste (1800s) de teste, **(C)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg, **(F)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(I)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. (* $p < 0,05$)

Análise de Variância (ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida pelo Teste U de Mann-Whitney. Grupos experimentais: SS, $n=10$; SM0,5, $n=9$; SM1,0, $n=10$; SM1,5, $n=10$; MS, $n=10$; MM0,5, $n=10$; MM1,0, $n=10$; MM1,5, $n=10$

Figura 13 – Número de vezes em que a rata busca os filhotes

Animais pré-tratados com 3.5mg/Kg de morfina ou solução salina ao final da gestação, e testados agudamente com doses desafios de 0,5; 1,0 e 1,5 mg/Kg de morfina.

Tempo em segundos que a rata despendeu para *grooming* em seus filhotes antes de comer insetos durante o tempo total de teste, **(A)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(C)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(E)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg. Tempo em segundos que a rata despendeu para *grooming* em seus filhotes após comer insetos durante o tempo total de teste, **(B)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(D)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(F)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg.

Análise de Variância (ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida pelo Teste U de Mann-Whitney. Grupos experimentais: SS, n=10; SM0,5, n=9; SM1,0, n=10; SM1,5, n=10; MS, n=10; MM0,5, n=10; MM1,0, n=10; MM1,5, n=10

Figura 14 – Tempo gasto pela fêmea fazendo *grooming* nos filhotes

Animais pré-tratados com 3,5mg/Kg de morfina ao final da gestação, e testados agudamente com doses desafios de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/Kg de morfina.

Percentual de fêmeas que agruparam 5 filhotes da ninhada **(A)** desafiados agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(C)** desafiados agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(E)** desafiados agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. Percentual de fêmeas que agruparam todos os 8 filhotes **(B)** desafiados agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(D)** desafiados agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(F)** desafiados agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina (* $p < 0,05$). Teste de Fisher. Grupos experimentais: SS, n=10; SM0,5, n=9; SM1,0, n=10; SM1,5, n=10 MS, n=10; MM0,5, n=10; MM1,0, n=10; MM1,5, n=10.

Figura 15 - Agrupamento de filhotes

Animais pré-tratados com 3.5mg/Kg de morfina ao final da gestação, e testados agudamente com doses desafios de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/Kg de morfina.

Tempo em segundos em que as fêmeas efetuaram o comportamento de lamber e agrupar seus filhotes durante os primeiros 15 minutos (900s) de teste, **(A)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(B)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(C)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. Tempo em segundos em que as fêmeas efetuaram o comportamento de lamber e agrupar seus filhotes de 15 a 30 minutos (900-1800s) de teste, **(D)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(E)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(F)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. Tempo em segundos em que as fêmeas efetuaram o comportamento de lamber e agrupar seus filhotes durante o tempo total (1800s) de teste, **(G)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(H)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(I)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Análise de Variância (ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida pelo Teste U de Mann-Whitney. Grupos experimentais: SS, n=10; SM0,5, n=9; SM1,0, n=10; SM1,5, n=10; MS, n=10; MM0,5, n=10; MM1,0, n=10; MM1,5, n=10

Figura 16 – Agrupar e lamber filhotes

Percentual de ratas que efetuaram o comportamento de lamber e agrupar seus filhotes durante o tempo total (1800s) de teste, **(A)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(B)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(C)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$) Teste de Fisher. Grupos experimentais: SS, $n=10$; SM0,5, $n=9$; SM1,0, $n=10$; SM1,5, $n=10$; MS, $n=10$; MM0,5, $n=10$; MM1,0, $n=10$; MM1,5, $n=10$.

Figura 17 – Agrupar e lamber filhotes (%)

Animais pré-tratados com 3.5mg/Kg de morfina ao final da gestação, e testados agudamente com doses desafios de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/Kg de morfina.

Tempo em segundos em que as fêmeas apresentaram o comportamento de *arch ed back nursing* durante os primeiros 15 minutos (900s) de teste, (A) desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, (B) desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e (C) desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. Tempo em segundos em que as fêmeas apresentaram o comportamento de *arch ed back nursing* de 15 a 30 minutos (900-1800s) de teste, (D) desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, (E) desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e (F) desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. Tempo em segundos em que as fêmeas apresentaram o comportamento de *arch ed back nursing* durante o tempo total (1800s) de teste, (G) desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, (H) desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e (I) desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. (* $p < 0,05$)

Análise de Variância (ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida pelo Teste U de Mann-Whitney. Grupos experimentais: SS, $n=10$; SM0,5, $n=9$; SM1,0, $n=10$; SM1,5, $n=10$; MS, $n=10$; MM0,5, $n=10$; MM1,0, $n=10$; MM1,5, $n=10$

Figura 18 – *Arch ed back nursing*

Percentual de ratas que apresentaram o comportamento de *arched back nursing* durante o tempo total (1800s) de teste, **(D)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(H)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(L)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$) Teste de Fisher. Grupos experimentais: SS, $n=10$; SM0,5, $n=9$; SM1,0, $n=10$; SM1,5, $n=10$; MS, $n=10$; MM0,5, $n=10$; MM1,0, $n=10$; MM1,5, $n=10$.

Figura 19 – *Arched back nursing* (%)

Animais pré-tratados com 3.5mg/Kg de morfina ao final da gestação, e testados agudamente com doses desafios de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/Kg de morfina.

Percentual de ratas que apresentaram *Full Maternal Behavior* durante o tempo total (1800s) de teste, **(A)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(B)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(C)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina.

Teste de Fisher. Grupos experimentais: SS, n=10; SM0,5, n=9; SM1,0, n=10; SM1,5, n=10; MS, n=10; MM0,5, n=10; MM1,0, n=10; MM1,5, n=10.

Figura 20 – Percentual de ratas que manifestaram *Full Maternal Behavior* (F.M.B.)

Animais pré-tratados com 3.5mg/Kg de morfina ao final da gestação, e testados agudamente com doses desafios de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/Kg de morfina.

Tempo em segundos em que as fêmeas permaneceram paradas, sem manifestar qualquer tipo de comportamento, durante os primeiros 15 minutos (900s) de teste, **(A)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(B)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(C)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. Tempo em segundos em que as fêmeas permaneceram paradas, sem manifestar qualquer tipo de comportamento de 15 a 30 minutos (900-1800s) de teste, **(D)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(E)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(F)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. Tempo em segundos em que as fêmeas permaneceram paradas, sem manifestar qualquer tipo de comportamento durante o tempo total (1800s) de teste, **(G)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(H)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(I)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina.

Análise de Variância (ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida pelo Teste U de Mann-Whitney. Grupos experimentais: SS, n=10; SM0,5, n=9; SM1,0, n=10; SM1,5, n=10; MS, n=10; MM0,5, n=10; MM1,0, n=10; MM1,5, n=10

Figura 21 – Tempo em que a fêmea permaneceu parada

Animais pré-tratados com 3.5mg/Kg de morfina ao final da gestação, e testados agudamente com doses desafios de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/Kg de morfina.

Tempo em segundos em que as fêmeas realizaram *self grooming* antes de comer insetos durante o tempo total de teste, **(A)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(C)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(E)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. Tempo em segundos em que as fêmeas realizaram *self grooming* após comer insetos durante o tempo total de teste **(B)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(D)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(F)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina.

Análise de Variância (ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida pelo Teste U de Mann-Whitney. Grupos experimentais: SS, n=10; SM0,5, n=9; SM1,0, n=10; SM1,5, n=10; MS, n=10; MM0,5, n=10; MM1,0, n=10; MM1,5, n=10

Figura 22 – Tempo em que a rata realizou o comportamento de *self grooming*

Animais pré-tratados com 3,5mg/Kg de morfina ou solução salina ao final da gestação, e testados agudamente com doses desafios de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/Kg de morfina.

Tempo em que as ratas permaneceram explorando a caixa experimental durante os primeiros 15 minutos (900s) de teste, **(A)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(D)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(G)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. Tempo em que as ratas permaneceram explorando a caixa experimental de 15 a 30 minutos (900-1800s) de teste, **(B)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(E)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(H)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. Tempo em que as ratas permaneceram explorando a caixa experimental durante o tempo total de teste (1800s), **(C)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(F)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(I)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Análise de Variância (ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida pelo Teste U de Mann-Whitney. Grupos experimentais: SS, $n=10$; SM0,5, $n=9$; SM1,0, $n=10$; SM1,5, $n=10$; MS, $n=10$; MM0,5, $n=10$; MM1,0, $n=10$; MM1,5, $n=10$

Figura 23 – Comportamento Exploratório

Animais pré-tratados com 3,5mg/Kg de morfina ao final da gestação, e testados agudamente com doses desafios de 0,5; 1,0 e 1,5 mg/Kg de morfina.

Número de contatos que as fêmeas efetuaram com insetos durante os primeiros 15 minutos (900s) de teste, **(A)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(D)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(G)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg. Número de contatos que as fêmeas efetuaram com insetos de 15 a 30 minutos (900-1800s) de teste, **(B)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(E)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(H)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. Número de contatos que as fêmeas efetuaram com insetos durante o tempo total de teste (1800s) de teste, **(C)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg, **(F)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(I)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. (* $p < 0,05$)

Análise de Variância (ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida pelo Teste U de Mann-Whitney. Grupos experimentais: SS, $n=10$; SM0,5, $n=9$; SM1,0, $n=10$; SM1,5, $n=10$; MS, $n=10$; MM0,5, $n=10$; MM1,0, $n=10$; MM1,5, $n=10$

Figura 24 - Número de contatos com insetos

Animais pré-tratados com 3,5 mg/Kg de morfina ao final da gestação e testados agudamente com doses desafio de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/Kg de morfina.

Latências para a captura da 1ª barata durante o período total do teste (A) animais desafiados agudamente com 0,5 mg/Kg de morfina, (D) desafiados agudamente com 1,0 mg/Kg de morfina e (G) desafiados agudamente com 1,5 mg/Kg de morfina. Latências para a captura da 5ª barata durante o período total de teste (B) animais desafiados agudamente com 0,5 mg/Kg de morfina, (E) desafiados agudamente com 1,0 mg/Kg de morfina e (H) desafiados agudamente com 1,5 mg/Kg de morfina. Latências para a captura da 1ª à 5ª barata durante o período total de teste (C) animais desafiados agudamente com 0,5 mg/Kg de morfina, (F) desafiados agudamente com 1,0 mg/Kg de morfina e (I) desafiados agudamente com 1,5 mg/Kg de morfina. (# $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Análise de Variância (ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida pelo Teste U de Mann-Whitney. Grupos experimentais: SS, $n=10$; SM0,5, $n=9$; SM1,0, $n=10$; SM1,5, $n=10$; MS, $n=10$; MM0,5, $n=10$; MM1,0, $n=10$; MM1,5, $n=10$

Figura 25 – Latência para captura de insetos

Animais pré-tratados com 3,5mg/Kg de morfina ao final da gestação, e testados agudamente com doses desafio de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/Kg de morfina.

Percentual de fêmeas que capturaram os 5 insetos durante o tempo total de teste (1800s) **(A)** desafiados agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(B)** desafiados agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(C)** desafiados agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Teste de Fisher. Grupos experimentais: SS, $n=10$; SM0,5, $n=9$; SM1,0, $n=10$; SM1,5, $n=10$ MS, $n=10$; MM0,5, $n=10$; MM1,0, $n=10$; MM1,5, $n=10$.

Figura 26 – Percentual de captura dos cinco insetos

Animais pré-tratados com 3,5mg/Kg de morfina ou solução salina ao final da gestação, e testados agudamente com doses desafios de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/Kg de morfina.

Tempo em que as ratas ficaram comendo insetos durante os primeiros 15 minutos (900s) de teste, **(A)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(D)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(G)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. Tempo em que as ratas ficaram comendo insetos de 15 a 30 minutos (900-1800s) de teste, **(B)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(E)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(H)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina. Tempo em que as ratas ficaram comendo insetos durante o tempo total de teste (1800s), **(C)** desafiadas agudamente com 0,5mg/Kg de morfina, **(F)** desafiadas agudamente com a dose de 1,0mg/Kg de morfina e **(I)** desafiadas agudamente com a dose de 1,5mg/Kg de morfina.

Análise de Variância (ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida pelo Teste U de Mann-Whitney. Grupos experimentais: SS, n=10; SM0,5, n=9; SM1,0, n=10; SM1,5, n=10; MS, n=10; MM0,5, n=10; MM1,0, n=10; MM1,5, n=10

Figura 27 – Tempo gasto pela rata comendo insetos

**"A análise experimental do comportamento favorece a nossa compreensão dos sentimentos por esclarecer os papéis dos ambientes passado e presente."
(Skinner)**

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os opióides modulam a expressão do CM. A morfina é um opióide que exerce influência sobre o desempenho do CM. Investigações por meio da manipulação farmacológica deste comportamento têm sido feitas tanto com o uso de injeções periféricas bem como centrais.

A morfina mimetiza os opióides endógenos por sua ação nos receptores opioidérgicos no SNC. Injeções intracerebroventriculares de β -endorfina bloqueiam a expressão do CM de maneira dose dependente, sugerindo que mudanças nos níveis de opióides endógenos altera a resposta maternal em ratas (FELICIO et al., 1991; MANN et al., 1995). Trabalhos prévios realizados em nosso laboratório com doses similares de morfina foram insuficientes para inibir o CM em fêmeas lactantes não expostas a quaisquer tipo de tratamento ao final da gestação e testadas apenas com seus filhotes (MIRANDA-PAIVA, et. al., 2001, 2003; YIM et. al., 2006). Sukikara et al. (2007), demonstraram que ratas expostas simultaneamente a filhotes e insetos tiveram o CM prejudicado apenas com o desafio agudo de morfina.

Os dados apresentados em relação aos experimentos aqui demonstrados reforçam as teorias de tolerância reversa. Adotaremos o termo “tolerância reversa” ao invés de “sensibilização” para que o sentido não se confunda com o de sensibilização de uma rata virgem após a exposição prolongada a filhotes, a qual resulta na expressão do comportamento maternal nestes animais (ROSENBLATT, 1967).

Os resultados demonstram que a menor dose desafio testada (0,5 mg/Kg) foi suficiente para inibir três importantes parâmetros de CM (agrupar e lambar filhotes, *arched back nursing* e agrupamento de filhotes). Todos os parâmetros do CM foram inibidos de maneira dose dependente. O pré-tratamento ao final da gestação, entretanto, gerou um efeito inibitório mais intenso sobre o CM, revelando de maneira clara o fenômeno de tolerância reversa na seleção comportamental. O CM pode ser prejudicado de maneira dose dependente quando se utiliza cocaína durante a gestação (NELSON et al., 1998), com resultados similares ao deste estudo em relação aos parâmetros de CM.

O pré-tratamento com morfina ao final da gestação, por si só, resulta em mudanças comportamentais durante a lactação. Fêmeas do grupo MS contataram mais seus filhotes do que as fêmeas do grupo SM1,0. Além disso passaram mais tempo agrupando e lambendo a ninhada, quando comparadas ao grupo SS. Estes dados sugerem que o tratamento prévio com morfina pode manifestar efeitos comportamentais tardios. Os opióides endógenos agindo nos receptores do sistema nervoso central poderiam modular parâmetros comportamentais durante a lactação.

Ambos os grupos MM1,5 e SM1,5 manifestaram inibição no comportamento de agrupar e lamber os filhotes. Por outro lado, parâmetros como número de busca de filhotes e percentual de fêmeas que manifestaram o comportamento de *arched back nursing*, os efeitos inibitórios da morfina foram revelados apenas em animais pré-tratados, revelando a tolerância reversa para esses dois parâmetros na maior dose desafio utilizada. Em geral, a dose desafio de 1,5mg/Kg parece resultar em respostas próximas às máximas no que se refere à mudança comportamental do cuidar para o caçar, assim esta não seria a melhor dose para revelar o fenômeno de tolerância reversa neste modelo comportamental.

Curiosamente, os grupos MM0,5 e MM1,0 manifestaram maior número de contatos com os filhotes quando comparados aos grupos SS, SM0,5 e SM1,0. Este aumento no número de contatos com filhotes no grupo MM1,0 pode ser correlacionado com o maior tempo que os animais destes grupos gastaram explorando a caixa. Animais destes grupos, ao explorarem mais o ambiente em busca dos insetos, muitas vezes acabavam pisando em cima dos filhotes, o que não deve ser interpretado como componente maternal propriamente dito, mas apenas como se os filhotes representassem um obstáculo para a mãe em relação à caça. Por outro lado, o grupo MM0,5 apesar de ter apresentado um aumento do número de contatos com os filhotes, não apresentou diferenças significantes em relação à exploração. Este fenômeno pode ser atribuído ao efeito excitatório induzido pelo pré-tratamento com morfina. O grupo MS apresentou maior número de contatos com seus filhotes quando comparado ao grupo SM1,0. Isso pode indicar que a estimulação opioidérgica durante a gestação é suficiente para aumentar o número de contatos com filhotes devido ao aumento da exploração da caixa experimental. É importante citar que o comportamento exploratório e o número de contatos com os filhotes não foram afetados pelo desafio agudo de 1,5 mg/Kg de morfina. Este dado

é importante pois confirma que nem mesmo a dose mais alta utilizada neste estudo foi capaz de induzir um efeito sedativo nos animais, que é característico da morfina em doses mais altas.

As latências para a captura do primeiro filhote foram maiores nos grupos SM1,5 e MM1,5, quando comparados ao grupo MS, e o número de buscas de filhotes foi menor no grupo MM1,5 quando comparado ao grupo SS. O comportamento de busca de filhotes envolve mais fatores motores e motivacionais do que fatores somatossensoriais, sugerindo que neste modelo comportamental, tais parâmetros podem ser menos sensíveis ao fenômeno de tolerância reversa. Vale citar que durante o teste comportamental, fêmeas do grupo SS usualmente faziam a busca e agrupamento de seus filhotes logo que os mesmos eram colocados na caixa experimental, para depois explorar o ambiente e os insetos. O mesmo não ocorria em fêmeas dos grupos MM, que faziam exatamente o oposto, indo em busca dos insetos e explorando a caixa experimental para depois, em poucos casos, iniciarem os cuidados com seus filhotes. Se observarmos com atenção a Figura 12, apesar das diferenças não serem estatisticamente significantes, tal resultado pode ser identificado. Durante o tempo total de teste, conforme aumenta a dose desafio de morfina, ocorre uma diminuição na busca dos filhotes.

O tempo em que a rata passou fazendo *grooming* em seus filhotes de maneira isolada não foi alterado antes nem após a fêmea comer insetos, durante o tempo total de teste. Isso sugere que nesse modelo e nessas doses, a morfina não influencia este parâmetro.

O agrupamento de parte da ninhada e do número total de filhotes utilizados no teste comportamental foi inibido de forma dose dependente. Sabe-se que o agrupamento de filhotes é uma das mais importantes manifestações de CM, pois a mãe busca seus filhotes para mantê-los unidos, e desta forma promover um melhor aquecimento dos mesmos, além do que, quando estão juntos, é muito mais fácil para a mãe amamentar, limpar e aquecer seus filhotes. Sabe-se que em ratas jovens, o pré-tratamento com morfina pode induzir a um aumento nos cuidados maternos com filhotes, conforme estudos de Zaias et al. (1996), porém, não foi o que ocorreu neste estudo, mesmo utilizando-se doses mais baixas do que no estudo citado anteriormente.

Pode-se dizer que o comportamento de agrupar e lambar filhotes é o mais sensível ao fenômeno de tolerância reversa neste estudo. As três doses desafio de morfina utilizadas comprometeram este parâmetro comportamental amplamente, mesmo nas análises dos blocos de tempo de forma isolada. Animais dos grupos MMs ainda gastaram menos tempo que os outros agrupando e lambendo seus filhotes. Isso sugere que as doses utilizadas no desafio farmacológico são altamente eficazes para inibir comportamentos da mãe em relação aos seus filhotes.

A dose de 0,5mg/Kg de morfina promoveu a inibição dos comportamentos de agrupar e lambar os filhotes e *arched back nursing* no grupo MM, apesar de apenas o desafio agudo com a mesma dose não ter sido capaz de interferir nestes mesmos parâmetros. Esta diferença persiste para o comportamento de agrupar e lambar os filhotes quando utilizamos a dose de 1,0 mg/Kg. Este fato sugere que parâmetros que envolvem uma interação somatosensorial mais direta seriam mais sensíveis para revelar os mecanismos da tolerância reversa. Foi demonstrado por FEBO et al. (2008), que durante a manifestação de *nursing* pelas ratas mães, várias regiões do córtex somatosensorial são ativadas, tais como, córtex visual, auditivo e olfatório, demonstrando a alta complexidade deste comportamento.

O comportamento maternal total (*full maternal behavior* – FMB) esteve prejudicado de uma forma geral, mesmo nos animais do grupo controle SS. Este fato pode ser explicado pela presença dos insetos na caixa experimental, que serve como um agente que instiga a curiosidade das ratas, de uma forma geral. Uma vez que na natureza, ratas são predadoras de baratas e outros insetos, as ratas de nosso biotério jamais haviam tido contato com baratas, mas mesmo assim contataram e caçaram estes insetos. Percebe-se que as ratas passaram pouquíssimo tempo sem manifestar nenhuma atividade. Curiosamente, não houve diferença estatisticamente significativa no parâmetro tempo em que os animais permaneceram parados. Isso talvez se deva ao fato das ratas terem que dividir seu tempo entre caçar e cuidar de seus filhotes. Assim, em todos os grupos a competição entre caçar insetos ou cuidar da prole parece ter resultado na redução do tempo em que estes animais ficaram parados.

Dividir a análise do parâmetro de *self grooming* em antes e depois de comer insetos, teve um objetivo estratégico, pois se sabe que a fêmea pode aumentar a quantidade de tempo gasto em *self grooming* com o objetivo de aumentar a

produção de leite para seus filhotes, ao passo que também serve para uma limpeza propriamente dita da rata (ROSENBLATT, 1967; SERAFIM; FELICIO, 2002). Mesmo com esta divisão, não foi observada diferença estatisticamente significativa na avaliação deste parâmetro comportamental.

Animais do grupo SS na sua maior parte agrupavam os filhotes antes de começar a explorar a caixa. Assim a exploração do ambiente apresentado por essas mães talvez se deva mais à curiosidade com uma situação inusitada, qual seja, a introdução de baratas na caixa experimental. Os resultados apresentados evidenciam e reforçam a idéia de que os animais tratados e desafiados com morfina têm o comportamento maternal inibido. A ativação opioidérgica da parte lateral da substância cinzenta periaquedutal (PAGl), estimula o comportamento predatório e parece ter um papel importante na seleção de comportamentos também durante a lactação (SUKIKARA et al., 2006), além de estar envolvida na modulação de outros comportamentos como *nursing*, comportamento sexual, agressivo e medo. Fêmeas com lesão na região caudal da PAG (PAGc) manifestam postura de aleitamento deficiente em relação às fêmeas do grupo controle, e seus filhotes ganham menos peso, como consequência de uma amamentação deficiente (LONSTEIN et al., 1998).

Um estudo realizado por Slamberová et al. (2001) demonstrou que ratas tratadas com morfina em doses maiores do que as usadas pelo nosso grupo de pesquisas durante o final da gestação levaram a uma diminuição na expressão do comportamento maternal e a um aumento nos comportamentos não maternais, como, farejar, levantar e *self grooming*. Os dados aqui descritos são similares aos resultados de Slamberová et al. (2001) para o comportamento exploratório. As ratas pré-tratadas com morfina e desafiadas com a dose de 1,0mg/Kg passaram maior tempo explorando a caixa experimental. Slamberová et al. (2001) demonstrou ainda que a atividade maternal é alta durante a fase clara do dia, período não ativo, e a atividade não-maternal é alta durante a fase escura, período de atividade destes roedores. Nosso estudo demonstra que as ratas do grupo MM1,0 tendem a explorar mais, mesmo na fase clara do dia, pois o teste comportamental foi realizado sempre nas primeiras horas da manhã, por volta de 8h00, horário em que as ratas teriam sua atividade maternal elevada. Esse fato ocorre possivelmente pela sensibilização à morfina, que pode aumentar a ambulação em roedores (KORNETSKY, 2004).

Fêmeas previamente tratadas com morfina e desafiadas agudamente com 1,0 mg/Kg da mesma droga ficam mais tempo explorando a caixa experimental, algo que pode ser atribuído a um aumento de motivação para a realização deste comportamento. Conseqüentemente podemos também afirmar que quanto mais a rata explora a caixa experimental, menos tempo se dedica aos cuidados com a prole. O aumento no tempo de exploração da caixa experimental não foi observado com a maior dose desafio utilizada (1,5 mg/Kg). Em um estudo anterior do grupo foi observado que o aumento da atividade locomotora ocorre em ratas desafiadas com a dose de 1,5mg/Kg de morfina quando pré-tratadas antes do acasalamento, porém durante a gestação, o mesmo aumento na atividade locomotora não foi observado (YIM et al., 2006).

Sabe-se que os opióides possuem um importante papel no consumo de alimento, especialmente nos aspectos de recompensa de comida (POMONIS et al., 2000). O estímulo à caça predatória ocorreu na dose desafio de 1,5 mg/Kg. Assim, no presente estudo, as doses de 0,5mg/Kg e 1,0mg/Kg não foram capazes de estimular a caça predatória independentemente do pré-tratamento. Curiosamente, nenhuma das três doses testadas gerou diferença estatisticamente significativa em relação à captura da primeira barata. Talvez isso possa significar que a motivação para a rata começar a caçar as baratas seja a mesma independente da dose desafio utilizada, neste paradigma de estudo. Uma vez que estas ratas não foram privadas de alimento e água, resta investigar de uma forma mais minuciosa tais aspectos motivacionais.

Em relação ao comportamento predatório, confirmando estudos anteriores da equipe, a estimulação opioidérgica facilita a manifestação deste comportamento. Houve um aumento no percentual de ratas que capturaram todos os cinco insetos que foi dose dependente, entretanto, a menor dose de 0,5 mg/Kg foi insuficiente para alterar este parâmetro, ao passo de que a dose de 1,0 mg/Kg aumentou o percentual de animais que capturaram os 5 insetos, mas apenas nas ratas que foram pré-tratadas ao final da gestação (grupo MM1,0). A dose de 1,5 mg/Kg aumentou o percentual de caça nas fêmeas, independente do pré-tratamento. Estes dados nos mostram que a dose de 1,0 mg/Kg de morfina parece ser a melhor para revelar o fenômeno de tolerância reversa em relação ao comportamento de caça. O fato dos parâmetros de CM aqui analisados terem sido mais influenciados pela

morfina do que a caça predatória sugere que a modulação opioidérgica seja mais relevante para o CM do que para a caça predatória.

Estudos recentes de nossa equipe demonstram que o pré-tratamento com antagonista de receptores opióides (naloxona), pode reverter os efeitos da morfina sobre os comportamentos maternal e predatório. O pré-tratamento com a naloxona restabeleceu o comportamento maternal enquanto diminuiu a caça em animais tratados com morfina. Estes resultados sugerem que os efeitos da morfina em ambos os comportamentos, maternal e predatório, se devem às suas ações sobre os receptores opióides. Assim, a transmissão opioidérgica pode inibir o comportamento social e estimular o comportamento predatório (PANKSEPP et al., 1980; SUKIKARA et al., 2007). O papel interativo das várias regiões do cérebro envolvidas neste fenômeno, bem como da plasticidade dos receptores de opióides neste contexto precisa ser investigado com mais detalhes.

No presente estudo, os animais pré-tratados com morfina e desafiados com 0,5 mg/Kg desta droga apresentaram inibição do CM sem alterações visíveis no comportamento predatório. Este resultado pode ter sua causa no fenômeno de tolerância reversa à estimulação opioidérgica de outras regiões do sistema nervoso central que têm um papel no CM. Neste caso, uma forte candidata seria a área pré-óptica medial (APOM). Esta região, além de ser um sítio importante para a expressão deste comportamento, tem receptores para opióides que, quando estimulados, provocam a inibição do CM. Entretanto, esta interpretação não explica porque, em estudos anteriores, o mesmo tratamento não inibiu o CM de ratas testadas na gaiola apenas com seus filhotes. Uma interpretação alternativa para estes resultados está baseada na hipótese de Panksepp et al. (1980). Esses autores argumentam que a transmissão opioidérgica é um fator importante no controle da interação social. Se considerarmos a relação mãe-filhote nesse contexto, isso poderia explicar os efeitos diferentes do mesmo tratamento de acordo com o paradigma do teste comportamental. Esta hipótese poderia ser testada em um ambiente enriquecido no qual a rata tenha oportunidade de apresentar outros comportamentos como o de interação social como alternativa às duas opções, caçar ou cuidar da prole, apresentadas no presente paradigma.

Trabalhos prévios sobre as bases neurais do prejuízo do CM induzido pela morfina revelaram uma ativação opioidérgica da PAGrl, local considerado crítico na

modulação motivacional dos comportamentos de predação e forrageamento (MIRANDA-PAIVA et al., 2003, 2007; SUKIKARA et al., 2006, 2007). Em contraste com a porção ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal (PAGvl), que parece estar diretamente envolvida no controle de um grande número de respostas comportamentais maternas (LONSTEIN; STERN, 1997, 1998), a PAGrl não parece enviar projeções para qualquer parte da circuitaria neural que controla respostas maternas (MOTA-ORTIZ et al., 2009). De fato, um dos principais alvos da PAGrl é um grupo de células orexinérgicas do hipotálamo lateral, que tem sido associado com o aumento da atividade locomotora em alguns estudos, aumentando potencialmente a motivação de caça, assim como a busca por alimentos durante o forrageamento (SAPER et al., 2002; MOTA-ORTIZ et al., 2009).

Mecanismos adaptativos fornecem substratos para que a mãe divida seu tempo entre caçar e cuidar de sua prole. Tais escolhas podem aumentar significativamente a sobrevivência de uma determinada espécie. Sabe-se que filhotes de mães que despendem mais tempo fazendo *grooming*, lambendo e manifestando maior tempo em *arched back nursing*, têm um aumento de receptores do tipo NMDA no hipocampo, o que pode significar um animal adulto com maior capacidade cognitiva (BREDY et al., 2003). A fêmea lactante deve dividir seu tempo de maneira mais eficiente do que uma fêmea virgem, o que colocará em jogo além da sobrevivência da ninhada, a sua própria sobrevivência. A gravidez e a maternidade em ratas têm sido relacionadas a uma melhora no comportamento predatório (FERGUSON et al., 2008).

Os mecanismos adaptativos aqui discutidos podem influenciar as chances de sobrevivência e determinar o número de descendentes da prole. Os mecanismos neurais envolvidos nestes processos são importantes por ajudarem a fêmea maternal a balancear entre reprodução e subsistência, e conseqüentemente, a manutenção de sua espécie na natureza (HRDY, 1999).

**"O homem nunca poderá ser
igual a um animal:
ou eleva-se e torna-se melhor,
ou se precipita e torna-se
muito pior"
(Soloiev)**

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- œ A mudança do comportamento maternal para a caça predatória em ratas lactantes é estimulada agudamente por morfina de maneira dose dependente (0,5; 1,0 e 1,5mg/Kg).
- œ A tolerância reversa a opióides ocorre para a inibição do CM induzida por morfina em ratas lactantes.
- œ A tolerância reversa a opióides ocorre para a estimulação da caça predatória induzida por morfina em ratas lactantes.
- œ O padrão de tolerância reversa ao estímulo opioidérgico é mais evidente para a inibição do comportamento maternal do que para a estimulação da caça predatória.
- œ A modulação opioidérgica da mudança do comportamento maternal para a caça predatória é plástico e adaptativo.

"Quando uma pessoa descreve os seus pensamentos, sentimentos ou suposições, tudo isso é comportamento. Entender os pensamentos e sentimentos de uma pessoa é conhecer as condições em que ela expressa esses sentimentos e pensamentos, bem como as relações funcionais entre essas condições e aquelas expressões."
(Matos)

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

BREDY, T. W.; HUMPARTZOOMIAN, R. A.; CAIN, D. P.; MEANEY, M. J. Partial reversal of the effect of maternal care on cognitive function through environmental enrichment. **Neuroscience**, v. 118, n. 2, p. 571-576, 2003.

BODNAR, R. J.; HADJIMARKOU, M. M. Endogenous opiates and behavior. **Peptides**, v. 24, p. 1241-1302, 2003.

BRIDGES, R. S.; GRIMM, C. T. Reversal of morphine disruption of maternal behavior by concurrent treatment with the opiate antagonist naloxone. **Science**, v. 218, p. 166-168, 1982.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N.S. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behavioural Brain Research**, v. 138, p. 17-28, 2003.

CONNELL, P. H. **Amphetamine Psychosis**. Londres: Chapman and Hill, 1958.

CRAIN, S. M.; SHEN, K. F. Modulation opioid of analgesia, tolerance and dependence by Gs-coupled, GM1 galgliside-regulated opioid receptor functions. **Trends in Pharmacological Science**, v. 19, p. 358-365, 1998.

DEAK, T.; ARAKAWA, H.; BEKKEDAL, M. Y.; PANKSEPP, J. Validation of a novel social investigation task that may dissociate social motivation from exploratory activity. **Behavioural Brain Research**, v. 199, n. 2, p. 326-333, 2009.

DEROCHE, V.; PIAZZA, P. V.; CASOLINI, P.; MACCARI, S.; LE MOAL, M.; SIMON, H. Stress-induced sensitization to amphetamine and morphine psychomotor effects depends on stress-induced corticosterone secretion. **Brain Research**, v. 598, p. 343-348, 1992.

DOWNS, A.; EDDY, N. B. The effect of repeated doses of cocaine on the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 46, p. 199-202, 1932.

ERDTMANN-VOURLIOTIS, M.; MAYER, P.; RIECHERT, U.; GRECKSCH, G.; HÖLLT, V. Identification of brain regions that are markedly activated by morphine in tolerant but in naïve rats. **Molecular Brain Research**, v. 61, p. 51-61, 1998.

FEBO, M.; STOLBERG, T. L.; NUMAN, M.; BRIDGES, R. S.; KULKARNI, P.; FERRIS, C. F. Nursing stimulation is more than tactile sensation: It is a multisensory experience. **Hormones and Behavior**, v. 54, n. 2, p. 330-339, 2008.

FELICIO, L. F.; MANN, P. E.; BRIDGES, R. S. Intracerebroventricular cholecystokinin infusions block beta-endorphine-induced disruption of maternal behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 39, p. 201-204, 1991.

FELICIO L. F.; CANTERAS, N. S. Maternal choices: neural mediation-caring for young or hunting. In: BRIDGES (Ed). **Neurobiology of the parental brain**, Amsterdam, Elsevier, v. 1, p. 75-82, 2008.

FERGUSON, T. R.; FERGUSON, T.; VICTORIA, L.; NORKUNAS, T.; WORTHINGTON-STONEMAN, D.; JONES, C.; FRENCH, K.; SKURKA, D.; CHAN, C.; BARANOVA, A.; FELICIO, L. F.; LAMBERT, K. G.; KINSLEY, C. H. Diminution of deposits of aging-related neurodegenerative substances in the brains of maternal rats. **Society of Neuroscience Abstracts**, v. 34, n. 794.4, 2008.

FRANCIS, K.; MEDDLE, S. L.; BISHOP, V. R.; RUSSEL, J. A. Progesterone receptor expression in the pregnant and parturient rat hypothalamus and brainstem. **Brain Research**, v. 927, p. 18-26, 2002.

FRIEDMAN, M. I.; BRUNO, J. P. Letter: Exchange of water during lactation. **Science**, v. 191, n. 4225, p. 409-410, 1976.

HRDY, S. B. Mother nature: maternal instincts and how they shape the human species. **Ballentine Publishing Group**, New York, 1999.

KORNETSKY, C. Brain-stimulation reward, morphine-induced oral stereotypy, and sensitization: implications for abuse. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, p. 777-786, 2004.

LONSTEIN, J. S.; STERN, J. M. Role of the midbrain periaqueductal gray in maternal nurturance and aggression: *c-fos* and electrolytic lesion studies in lactating rats. **Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 3364-3378, 1997.

LONSTEIN, J. S.; STERN, J. M. Site and behavioral specificity of periaqueductal gray lesions on postpartum sexual, maternal, and aggressive behaviors in rats. **Brain Research**, v. 804, p. 21-35, 1998.

LONSTEIN, J. S. Reduced anxiety in postpartum rats requires recent physical interactions with pups, but is independent of suckling and peripheral sources of hormones. **Hormones and Behavior**, v. 47, n. 3, p. 241-255, 2005.

MANN, P. E.; FELICIO, L. F.; BRIDGES, R. S. Investigation into the role of cholecystinin (CCK) in the induction and maintenance of maternal behavior in rats. **Hormones and Behavior**, v. 29, p. 392-406, 1995.

MATTSON, B. J.; WILLIAMS, S.; ROSENBLATT, J. S.; MORREL, J. I. Comparison of two positive reinforcing stimuli: pups and cocaine throughout the postpartum period. **Behavioral Neuroscience**, v. 115, p. 683-694, 2001.

MATTSON, B. J.; WILLIAMS, S.; ROSENBLATT, J. S.; MORREL, J. I. Preferences for cocaine- or pup-associated chambers differentiates otherwise behaviorally identical postpartum maternal rats. **Psychopharmacology Berlin**, v. 167, n. 1, p. 1-8, 2003.

MEUSER, T.; GIESECKE, T.; GABRIEL, A.; HORSCH, M.; SABATOWSKIN, R.; HESCHELER, J.; GRONDM, S.; PALMERM, P. P. Mu-opioid receptor mRNA regulation during morphine tolerance in the rat peripheral nervous system. **Anesthesia & Analgesia**, v. 97, p. 1458-1463, 2003.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; FELICIO, L. F. Differential role of cholecystinin receptor subtypes in opioid modulation of ongoing maternal behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 64, p. 165-169, 1999.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; NASELLO, A. G.; YIN, A. J.; FELICIO, L. F. Morphine pretreatment increases opioid inhibitory effects on maternal behavior. **Brain Research Bulletin**, v. 55, p. 501-505, 2001.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S.; FELICIO, L. F. A role for the periaqueductal gray in opioidergic inhibition of maternal behavior. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 667-674, 2003.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; CANTERAS, N. S.; SUKIKARA, M. H.; NASELLO, A. G.; MACROWIAC, I. I.; FELICIO, L. F. Periaqueductal gray cholecystokinin infusions block morphine-induced disruption of maternal behavior. **Peptides**, v. 28, p. 657-662, 2007.

MOLLEREAU, C.; PARMENTIER, M.; MAILLEUXM, P; BUTOUR, J. L.; MOISAND, C.; CHALON, P.; CAOUT, D.; VASSART, G.; MEUNIER, J. C. ORL1, a novel member of the opioidreceptor family: cloning, function expression and localization. **FEBS Letters**, v. 341, p. 33-38, 1994.

MOLTZ, H.; LUBIN, M.; LEON, M.; NUMAN, M. Hormonal induction of maternal behavior in the ovariectomized nulliparous rat. **Physiology and Behavior**, v. 5, p. 1373-1377, 1970.

MOTA-ORTIZ, S. R.; SUKIKARA, M. H.; FELICIO, L. F.; CANTERAS, N. S. Afferent connections to the rostralateral part of the periaqueductal gray: a critical region influencing the motivation drive to hunt and forage. **Neural Plasticity**, 2009:612698, 2009.

NELSON, C. J.; METER, K. E.; WALKER, C. H.; AYERS, A. A. A dose-response study of chronic cocaine on maternal behavior in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 20, n. 6, p. 657-660, 1998.

NUMAN, M. Maternal Behavior. In: KNOBIL; NEILL. **The Physiology of Reproduction**, New York, Raven Press, v. 1, p. 221-300, 1994.

OLSON, G. A.; OLSON, R. D.; KASTIN, A. J.; COY, D. H. Endogenous opiates: 1981. **Peptides**, v. 3, n. 6, p. 1039-1072, 1982.

OTONI, E. B. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. **Behavior Research Methods**, v. 32, n. 3, p. 446-449, 2000.

PANKSEPP, J.; DEESQUINAZI, F. G. Opiates and homing. **Journal of Comparative Physiology and Psychology**, v. 94, n. 4, p. 650-663, 1980.

POMONIS, J. D.; JEWETT, D. C.; KOTZ, C. M.; BRIGGS, J. E.; BILLINGTON, C. J.; LEVINE, A. S. Sucrose consumption increases naloxone-induced c-Fos immunoreactivity in limbic forebrain. **American Journal of Physiology**, v. 278, p. 712-719, 2000.

ROSENBLATT, J. S. Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. **Science**, v. 156, n. 781, p. 1512-1541, 1967.

SANYAL, M. K. Secretion of progesterone during gestation in the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 79, p. 179-190, 1978.

SAPER, C. B.; CHOU, T. C.; ELMQUIST, J. K. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. **Neuron**, v. 36, p. 199-211, 2002.

SERAFIM, A. P.; FELICIO, L. F. Reproductive experience influences grooming behavior during pregnancy in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 3, p. 391-394, 2002.

SHAIKH, A. A. Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. **Biological Reproduction**, v. 5, p. 297-307, 1971.

SLAMBEROVÁ, R.; SZILÁGYI, B.; VATHY, I. Repeated morphine administration during pregnancy attenuates maternal behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, p. 565-576, 2001.

SPANAGEL, R. Modulation of drug-induced sensitization process by endogenous opioid systems. **Behavioural Brain Research**, v. 70, p. 37-49, 1995.

STERN, J. M. Offspring-induced nurturance: animal-human parallels. **Developmental Psychobiology**, v. 31, n. 1, p. 19-37, 1997.

STERN, J. M.; YU, Y. L.; CROCKETT, D. P. Dorsolateral columns of the spinal cord are necessary for both suckling-induced neuroendocrine reflexes and the kyphotic nursing posture in lactating rats. **Brain Research**, v. 947, n. 1, p. 110-121, 2002.

SUKIKARA, M. H.; MOTA-ORTIZ, S. R.; BALDO, M. V.; FELICIO, L. F.; CANTERAS, N. S. A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 9, p. 2583-2589, 2006.

SUKIKARA, M. H.; PLATERO, M. D.; CANTERAS, N. S.; FELICIO, L. F. Opiate regulation of behavioral selection during lactation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 87, p. 315-320, 2007.

TEODOROV, E.; MODENA, C. C.; SUKIKARA, M. H.; FELICIO, L. F. Preliminary study of the effects of morphine treatment on opioid receptor gene expression in brain structures of the female rat. **Neuroscience**, v. 141, p. 1225-1231, 2006.

TEODOROV, E.; TOMITA, A. T.; BANON, G. P.; GIL, I. G.; BERNARDI, M. M.; FELICIO, L. F. Behavioral effects of acute stimulation of kappa-opioid receptors during lactation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 4, p. 534-539, 2008.

TERKEL, J.; ROSENBLATT, J. S. Maternal behavior induced by maternal blood plasma injected into virgin rats. **Journal of Comparative Physiology and Psychology**, v. 65, n. 3, p. 479-482, 1968.

THORBOURN, G. D.; CHALLIS, J. R. G. Endocrine control of parturition. **Physiology Review**, v. 59, p. 863-918, 1979.

WASSERMAN, D. R.; LEVENTHAL, J. M. Maltreatment of children born to cocaine-dependent mothers. **American Journal of Diseases of Children**, v. 147, n. 12, p. 1324-1328, 1993.

WHISTLER, J. L.; CHUANG, H. H.; CHU, P.; JAN, L. Y.; VON ZASTROW, M. Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. **Neuron**, v. 23, p. 737-746, 1999.

YIM, A. J.; MIRANDA-PAIVA, C. M.; FLORIO, J. C.; OLIVEIRA, C. A.; NASELLO, A. C.; FELICIO, L. F. A comparative study of morphine treatment regimen prior to mating and during late pregnancy. **Brain Research Bulletin**, v. 68, p. 384-391, 2006.

ZAIAS, J.; OKIMOTO, L.; TRIVEDI, A.; MANN, P. E.; BRIDGES, R. S. Inhibitory effects of naltrexone on the induction of parental behavior in juvenile rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 53, n. 4, p. 987-993, 1996.

APÊNDICE

Os arquivos contidos neste CD são provenientes da edição de vídeos confeccionados durante a realização do experimento comportamental. Mostra a diferença entre ratas com comportamentos distintos devido a ação opioidegica. Preferencialmente deve ser aberto em Windows Media Player.