ALINE DE MELLO CRUZ

Motivação e ansiedade em fêmeas:
aspectos farmacológicos e reprodutivos

São Paulo
2013

ALINE DE MELLO CRUZ

Motivação e ansiedade em fêmeas:
aspectos farmacológicos e reprodutivos

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

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:
Prof. Dr. Luciano Freitas Felicio

São Paulo
2013

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.2841
FMVZ

Cruz, Aline de Mello
Motivação e ansiedade em fêmeas: aspectos farmacológicos e reprodutivos / Aline de Mello Cruz. -- 2013.
149 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Freitas Felício.

1. Comportamento materno. 2. Predação. 3. Hormônios. 4. Ansiedade. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Relevância neorológica da substância cinzenta periaquedutal e suas implicações para o comportamento maternal", protocolado sob o nº1193/2007, 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 "Neuroetologic relevance of the peraqueductal gray and its implications for the maternal behavior", protocol number 1193/2007, 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

Comissão de Ética para uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência da progesterona na seleção comportamental após o parto", protocolado sob o nº1760/2009, utilizando 100 (cem) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética para uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 24 de novembro de 2009.

We certify that the Research "The role of progesterone in behavioral selection during lactation", protocol number 1760/2009, utilizing 100 (one hundred) rats, under the responsibility Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethics Committee for animal use" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 11/24/09.

São Paulo, 27 de novembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Ação do proglumide sobre a modulação comportamental em ratas lactantes.", protocolado sob o nº 2797/2012, utilizando 34 (trinta e quatro) ratos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/2012.

We certify that the Research "Proglumide's action in behavioral modulation of lactating rats", protocol number 2797/2012, utilizing 34 (thirty four) rats, under the responsibility Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/2012.

São Paulo, 18 de outubro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

MICHIGAN STATE UNIVERSITY

MEMORANDUM

TO: Lonstein, Joseph S
Psychology
219 Giltner Hall

FROM: Dr. Ronald O. Bates, Chairperson
Institutional Animal Care and Use Committee

DATE: 08/03/2012

SUBJECT: APPROVAL OF APPLICATION TO USE VERTEBRATE ANIMALS IN RESEARCH

This is to notify you that your initial application, or annual renewal, to use vertebrate animals in research or teaching has been approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Initial applications are approved for a three-year period, pending submission of an Annual Renewal letter.

Yearly, three months before the anniversary date of the initial approval, you will be sent the Annual Renewal letter in which you will be asked to check the appropriate section, sign and return it to the IACUC office. **SHOULD YOUR PROJECT EXTEND BEYOND THE INITIAL THREE YEAR APPROVAL PERIOD, YOU MUST SUBMIT A NEW APPLICATION WHICH CAN BE FOUND ON OUR WEB SITE (www.iacuc.msu.edu).** Please note that, according to the Policies, Responsibilities and Procedures for Animal Use and Care at Michigan State University, no significant changes may be made to your research without submitting an amendment to the IACUC for review and approval before any changes can be implemented.

Animal Care Program

In order to be eligible for research funding from the National Institutes of Health (NIH), Michigan State University has filed with the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW) an assurance document which commits the university to compliance with NIH policy and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All principal investigators should be aware of the existence of this formal obligation.

Institutional Animal
Care and Use
Committee
Michigan State
University

Title: Neurobiological Control of Maternal Anxiety

Application #: 08/11-165-00

Funded By: National Institutes of Health (NICHD)

Original Approval Date: 08/04/2011

West Fee Hall
909 Fee Road, Room 421
East Lansing, MI 48824-1313

Expires: 08/04/2013

517-432-8103
Fax: 517-432-8105/cjf
iacuc@msu.edu
www.iacuc.msu.edu

CC: Dr. Juli Wade, Chairperson
Psychology
262B Psychology Building

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CRUZ, Aline de Mello

Título: Motivação e ansiedade em fêmeas: aspectos farmacológicos e reprodutivos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

A maior parte deste estudo foi realizada no Laboratório de Neurobiologia dos Comportamentos Reprodutivos no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo número 2009/53194-1.

Uma segunda parte deste estudo foi realizada no Laboratório do Prof. Dr. Joseph S. Lonstein no *Neuroscience Program* da *Michigan State University*, com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo número 2012/07008-4.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jussara e Claudio, que fizeram o possível e o impossível para que eu me tornasse uma pessoa melhor através de educação e 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.

À minha querida filha Julia, luz da minha vida, minha companheira, amiga de todas as horas, esteve ao meu lado nesta caminhada, sempre. Ela é a minha força e a minha direção. Ao meu marido Guilherme, pela compreensão na ausência, nos momentos de desânimo, sempre ao meu lado me apoiando incondicionalmente e acreditando nos meus sonhos e ideais.

Aos animais utilizados neste estudo, sempre por mim muito bem cuidados e respeitados, e que tiveram suas vidas encurtadas em benefício da Ciência, meu reconhecimento e agradecimento especial.

Aos animais de uma forma geral, seres tão fáceis de serem amados, e em particular os que dividiram parte de suas vidas comigo e me proporcionaram momentos ímpares de amor incondicional, por me ensinarem o quão rica é a expressão do comportamento animal.

Aos meus queridos Professores da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina, agradeço por todos os ensinamentos, por me ajudarem nas bases da realização de um sonho: ser MÉDICA VETERINÁRIA, com muito orgulho.

Ao Professor Dr. Luciano Freitas Felicio, pelos ensinamentos.

Aos Professores do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, os quais convivi durante todos esses anos na Pós Graduação, cada um foi importante para

mim e certamente me ajudou em algum momento desta caminhada. Serviram para que eu construísse na minha mente o exemplo de como eu gostaria de ser. Agradeço especialmente a Professora Dra. Helenice de Souza Spinosa, Professor Dr. João Palermo-Neto, Professora Dra. Silvana Lima Górnaiak e à nova Professora Dra. Cristina de Oliveira Massoco Sales Gomes, pelos ensinamentos em Farmacologia e Pesquisa.

Aos Professores do Departamento de Anatomia do ICB-USP, Professor Dr. Newton Sabino Canteras e Professor Dr. Jackson Cioni Bittencourt, por sempre me receberem de forma receptiva em seus laboratórios e solucionarem minhas dúvidas.

Aos funcionários do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, em especial Dr. Jorge Camilo Flório pela ajuda sempre com muito boa vontade e bom humor, e à Dra. Claudia Mori pelos ensinamentos com animais de Biotério. Aos funcionários do Biotério, em especial Idalina, Rosires e Nelson, sempre prestativos a ajudar. Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia, Herculano, Vagner e Nicole, por toda a ajuda, simpatia e companheirismo. A todos os funcionários em geral, pela excelente convivência ao longo destes anos.

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia dos Comportamentos Reprodutivos, pelos momentos de companheirismo, pelo apoio em horas difíceis, pela tolerância, agradeço em especial Marianne Orlandini Klein, Professora Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss e Renato Duarte Alvisi, pessoas que me fazem acreditar em seriedade na pesquisa, respeito, dedicação e competência.

Às minhas mais do que amadas e queridas alunas, Priscila Yatiyo, Pollyana Braga e Carla Nappo. Aprendi muito mais do que ensinei, e vocês serão sempre especiais em minha vida.

Ao Prof. Dr. Joseph Lonstein e toda a sua equipe, em especial Katrina Linning, Eman Amed, Allie Holschbach e Christina Ragan. Foi muito importante estar ao lado de pessoas que eu admirava de longe, e saber que eles são ainda melhores do que parecem. Por compreenderem minhas dificuldades e me apoiarem nos

momentos difíceis. A todos os alunos do *Neuroscience Program* da *Michigan State University*, pela paciência e pelos momentos descontraídos. *I am proud to be a Spartan!*

Aos Professores e alunos da Psicologia Experimental, Professora Dra. Emma Otta, Professora Dra. Vera Bussab, Professor Dr. Fernando Ribeiro, Professor Dr. Cesar Ades (*in memorian*), pessoas que admiro e ajudaram na melhor compreensão da Psicologia e dos Comportamentos Humano e Animal.

Aos funcionários da Biblioteca da FMVZ-USP, pela atenção e pelo carinho, por serem sempre prestativos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por financiar meu Doutorado e o meu estágio no exterior.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho e não foram aqui citados, meu agradecimento especial.

“Não é o mais forte que sobrevive,
nem o mais inteligente, mas o que
melhor se adapta às mudanças.”

“Para ser um bom observador,
é preciso ser um bom teórico.”

“A ignorância gera mais frequentemente
confiança do que conhecimento: são os
que sabem pouco, e não aqueles que sabem
muito, que afirmam de uma forma tão
categórica que este ou aquele problema
nunca será resolvido pela Ciência.”

“A compaixão para com os animais é das
mais nobres virtudes da natureza humana.”

Charles Darwin (1809 – 1882)

RESUMO

CRUZ, A. M. **Motivação e ansiedade em fêmeas:** aspectos farmacológicos e reprodutivos. [Female motivation and anxiety: pharmacology and reproductive aspects]. 2013. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O comportamento materno pode ser definido como a performance comportamental que a mãe expressa durante os momentos que abrangem desde o período imediato do pré-parto até o momento em que a prole é capaz de sobreviver sozinha sem os cuidados e a atenção materna. O estudo e entendimento dos mecanismos que modulam o comportamento materno podem ter focos diferenciados em relação às consequências na mãe, bem como nos filhotes. O entendimento dos mecanismos neuroanatômicos e neuroquímicos proveniente destes estudos em animais validam importantes fundamentos neurobiológicos de importância crucial para a sociedade em geral, em especial mães que sofrem de distúrbios em período perinatal. No ambiente natural, os animais frequentemente deparam com situações de conflito, e devem fazer escolhas entre diversos comportamentos fundamentais para sua manutenção, tais como alimentação, defesa e reprodução. O enriquecimento ambiental pode promover um impacto positivo ou negativo na expressão de determinados comportamentos. Observou-se um grande impacto da presença de maravalha no momento do teste comportamental, influenciando positivamente a expressão do comportamento materno. Entende-se como modulação (ou seleção) comportamental o ato do animal escolher entre dois ou mais tipos de comportamentos. Pesquisas recentes do nosso grupo de estudos sugerem que alterações no tônus opioide decorridas no terço final da gestação podem modular a expressão de padrões comportamentais no pós-parto. O presente estudo sugere que o pré-tratamento com progesterona durante o período gestacional pode modificar a sensibilidade aos opióides e seus efeitos sobre o comportamento materno e a seleção comportamental durante a lactação, porém em relação ao desafio farmacológico central, o fenômeno torna-se sutil pois não ocorre ação direta tanto da progesterona exógena quanto endógena na substância cinzenta periaquedutal rostro-lateral (PAGrl) ao que se refere ao controle desse paradigma de seleção comportamental. A ação da colecistocinina (CCK) na modulação do comportamento materno parece estar associada ao estado reprodutivo da fêmea

modulação em sítios neuroanatômicos específicos. O bloqueio inespecífico dos receptores de CCK neste paradigma de modulação comportamental foi eficiente apenas no que diz respeito ao fenômeno que envolve a saciedade das fêmeas, não promovendo prejuízo em parâmetros de comportamento materno. Em relação à experiência reprodutiva, ratas gestantes e lactantes apresentam melhores desempenhos na caça quando comparadas às ratas virgens, independentemente do desafio farmacológico utilizado. Assim como ocorre na maioria das mulheres, ratas também apresentam diminuição nos níveis de comportamento similar à ansiedade no pós-parto quando comparadas às ratas virgens. A diminuição nos níveis deste comportamento pode influenciar diretamente na habilidade materna. Neste estudo, tal efeito foi maior do que o efeito da própria droga na modulação do comportamento materno neste paradigma comportamental, atenuando a ação ansiogênica do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP).

Palavras-chave: Comportamento Materno, Predação, Hormônios, Ansiedade.

ABSTRACT

CRUZ, A. M. **Female motivation and anxiety:** pharmacology and reproductive aspects. [Motivação e ansiedade em fêmeas: aspectos farmacológicos e reprodutivos]. 2013. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Maternal behavior can be defined as the behavioral performance that the mother expresses from the immediate pre birth until offspring can survive alone without specific maternal care. The understanding of mechanisms involved in maternal behavior may have different approach related to mothers and the pups. Understanding the neuroanatomical and neurochemical mechanisms from these animal is important for society in general, specially for mothers suffering from psychological and physiological disorders in the perinatal period. In the natural environment, animals often face situations of conflict, and must make choices between different behaviors essential to their maintenance, such as feeding, defense and reproduction. Environmental enrichment can promote positive or negative impacts on the expression of certain behaviors. We observed a huge impact in the presence of pinus flakes at the moment of behavioral testing, positively influencing the expression of maternal behavior. Behavioral modulation (or selection) is when animals have to choose between two or more types of behaviors. Recent research from our group suggest that changes in opioid tone in the end of pregnancy can modulate the expression of behavioral patterns in postpartum. This study suggests that pretreatment with progesterone during pregnancy can change the sensitivity to opioids and its effect on maternal behavior and behavioral selection during lactation, but related central pharmacological challenge, the phenomenon become mild. Cholecystokinin (CCK) modulation of maternal behavior seems to be associated with the reproductive status and modulation of specific neuroanatomical sites. Blockage of specific CCK receptors in this behavioral modulation is only effective in satiation, but not related to maternal behavior parameters. Pregnant and lactating rats show better performances in hunt when compared to virgin rats, with no drug challenge effect. Lactating rats normally show a decrease in levels of anxiety-like behavior in postpartum period when compared to virgin rats. Decrease in anxiety levels can directly influence maternal ability to take care of their litter. In this study, this effect

was greater than the effect of the drug itself in modulation of anxiety behavior, attenuating the peptide calcitonin gene-related peptide (CGRP) anxiogenic effect.

Key words: Maternal Behavior, Predation, Hormones, Anxiety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Parâmetros de comportamento materno e atividade geral analisados no Experimento 1.....	60
Figura 2 - Parâmetros de comportamento materno e atividade geral analisados no Experimento 1.....	61
Figura 3 - Parâmetros de comportamento analisados no Experimento 2.....	65
Figura 4 - Parâmetros de comportamento analisados no Experimento 2.....	66
Figura 5 - Parâmetros de comportamento analisados no Experimento 2.....	67
Figura 6 - Parâmetros de comportamento analisados no Experimento 3.....	70
Figura 7 - Parâmetros de comportamento analisados no Experimento 5.....	75
Figura 8 - Parâmetros de comportamento analisados no Experimento 5.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros comportamentais analisados no Experimento 1.....	62
Tabela 2 - Parâmetros comportamentais analisados no Experimento 3.....	71
Tabela 3 - Parâmetros comportamentais analisados no Experimento 4.....	73
Tabela 4 - Parâmetros comportamentais analisados no Experimento 6.....	79
Tabela 5 - Parâmetros comportamentais analisados no Experimento 6.....	80

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	23
1.1 COMPORTAMENTO MATERNO: DEFINIÇÃO E CONCEITOS	24
1.1.1 Controle Hormonal	28
1.1.2 Sensibilização Comportamental e Farmacológica	30
1.1.3 Ação da Colecistocinina (CCK) no Comportamento	31
1.1.4 Controle Neural e Motivacional	33
1.1.5 Experiência Reprodutiva	35
1.1.6 Ansiedade Materna	36
1.2 COMPORTAMENTO PREDATÓRIO: DEFINIÇÃO E CONCEITOS	38
1.2.1 Controle Neural e Motivacional	39
1.2.2 Modulação Comportamental	40
2 OBJETIVOS	42
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 ANIMAIS	45
3.1.1 Acasalamento e Padronização da Ninhada	46
3.1.2 Habituação	47
3.1.3 Cirurgia Estereotáxica	48
3.1.4 Pré-tratamento com drogas	50
3.1.5 Testes Comportamentais	50
3.1.5.1 Teste de Comportamento Materno (Experimento 1)	51
3.1.5.2 Teste de Comportamento Materno (Experimento 6)	51
3.1.5.3 Teste de Seleção Comportamental e Predação	52
3.1.5.4 Teste de Labirinto em Cruz Elevado	53
3.2 LOCALIZAÇÃO DA INJEÇÃO EM SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)	54
3.3 DROGAS UTILIZADAS	55
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	57

4.1 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 1: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO MEDIANTE DIFERENTES DESAFIOS AMBIENTAIS.....	58
4.1.1 Resultados.....	58
4.2 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 2: INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM PROGESTERONA AO FINAL DA GESTAÇÃO E SUA POSSÍVEL INTERAÇÃO COM O SISTEMA OPIOIDÉRGICO SOBRE A MODULAÇÃO COMPORTAMENTAL EM RATAS LACTANTES.....	62
4.2.1 Resultados.....	63
4.3 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 3: MODULAÇÃO COMPORTAMENTAL APÓS A INJEÇÃO CENTRAL DE PROGESTERONA E MIFEPRISTONA NA PAGrl EM RATAS LACTANTES.....	68
4.3.1 Resultados.....	68
4.4 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 4: EFEITOS DO PROGLUMIDE NA MODULAÇÃO COMPORTAMENTAL EM RATAS LACTANTES.....	71
4.4.1 Resultados.....	72
4.5 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 5: EFEITOS DO PROGLUMIDE NO COMPORTAMENTO PREDATÓRIO DE RATAS FÊMEAS EM DIFERENTES FASES REPRODUTIVAS.....	73
4.5.1 Resultados.....	74
4.6 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DO PEPTÍDEO RELACIONADO AO GENE DA CALCITONINA (CGRP) EM ESTRUTURAS RELACIONADAS À ANSIEDADE EM RATAS LACTANTES.....	77
4.6.1 Resultados.....	78
5 DISCUSSÃO.....	81
6 CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS.....	94
APÊNDICES.....	112
APÊNDICE A – LOCALIZAÇÃO DAS INJEÇÕES NA REGIÃO DA PAGrl.....	113

APÊNDICE B – LOCALIZAÇÃO DAS INJEÇÕES NA REGIÃO DO vBST.....	114
APÊNDICE C – CIRURGIA ESTEREOTÁXICA (PROCEDIMENTOS).....	115
APÊNDICE D – PARÂMETROS DE COMPORTAMENTO.....	116
APÊNDICE E - MODULAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	117
APÊNDICE F – ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO.....	118
APÊNDICE F – PARECER DO PROF. DR. JOSEPH S. LONSTEIN SOBRE A REALIZAÇÃO DO ESTÁGIO.....	148
APÊNDICE G – CERTIFICADO DE CONCLUSÃO DA DISCIPLINA DE MICROSCOPIA CONFOCAL, REALIZADA NA <i>MICHIGAN STATE UNIVERSITY</i>, NO <i>CENTER FOR ADVANCED MICROSCOPY</i>, SOB SUPERVISÃO DA PROF. DRA. MELINDA FRAME.....	149

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 COMPORTAMENTO MATERNO: DEFINIÇÕES E CONCEITOS

O uso de modelos animais é amplamente utilizado em pesquisa nas mais diversas áreas e com amplas finalidades. Atualmente tem se buscado métodos alternativos para minimizar sempre que possível a pesquisa *in vivo*. Porém, certos modelos ainda são e possivelmente serão muito utilizados, e dentre eles encontram-se diversos exemplos para o estudo do comportamento animal. Investigações em modelos animais tornam-se altamente necessárias para o entendimento do mecanismo de funcionamento fisiológico das mais diversas síndromes e doenças que os seres humanos apresentam.

O estudo do comportamento animal pode ser feito em vida livre e de forma exclusivamente observacional, ou em ambiente controlado de forma experimental. Para estudos de investigação em neurobiologia dos comportamentos parentais, o modelo animal ainda é amplamente utilizado, pois é permitido ter um controle quase total do ambiente, sendo os animais de biotério dóceis, de fácil manipulação e contenção, apresentam ciclo de vida relativamente curto, sendo possível a análise de um grande número de animais gerando assim um volume de dados comportamentais compatível com estudos envolvendo comportamento.

O comportamento materno em animais pode ser definido como a performance comportamental que a mãe expressa durante os momentos que abrangem desde o período imediato do pré-parto até o momento em que a prole é capaz de sobreviver sozinha sem os cuidados e a atenção materna. O comportamento materno emerge muito próximo ao momento do parto. Inicialmente, ele é expresso pela construção do ninho, e gradativamente a mãe torna-se responsiva à prole lambendo seus filhotes, aquecendo, amamentando e protegendo seus filhotes contra agressões externas. Todos estes estímulos sensoriais fazem com que a mãe desenvolva novas habilidades imediatamente, incluindo atenção, percepção e flexibilidade comportamental (NUMAN; FLEMING; LEVY, 2006). O comportamento materno é composto por uma série de ações que, em conjunto, podem promover a manutenção

da vida da prole ou de parte dela afim de que a mesma atinja a idade reprodutiva, quando poderá dar continuidade ao ciclo da vida (FLEMING, 1989).

O estudo e entendimento dos mecanismos que modulam o comportamento materno podem ter focos diferenciados em relação às consequências na mãe, bem como na prole. O entendimento dos mecanismos neuroanatômicos e neuroquímicos proveniente destes estudos em animais validam importantes fundamentos neurobiológicos de importância crucial para a sociedade em geral, em especial mães que sofrem de distúrbios em período perinatal. Apenas para ressaltar, existem inúmeros aspectos a serem levados em consideração no estudo do comportamento materno, e diversos fatores hormonais, ambientais, neuroquímicos e neuroanatômicos que podem influenciar no mesmo. Nosso foco neste estudo é a motivação materna mediante a alguns tipos de desafios farmacológicos e ambientais.

A competência genética de uma fêmea é avaliada pelo número seus descendentes que sobrevivem até a idade adulta. Por isso, a competência reprodutiva da mãe apenas finaliza quando a sua prole for capaz de gerar novos descendentes. O processo de seleção natural pode favorecer animais reprodutivamente competentes, assim como aqueles que cuidam de maneira adequada de sua prole. Os filhotes de rato necessitam de cuidados especiais da mãe para que possam sobreviver, pois nos primeiros dias de vida não são capazes de manter sua temperatura corpórea e nem ao menos urinar e defecar sem a ajuda de sua mãe.

Os cuidados maternos podem ser divididos em cuidados diretos e indiretos. O parto por si só já é considerado o primeiro comportamento materno ativo, pois no momento do nascimento dos filhotes, a mãe começa a lambear incessantemente sua região anogenital, e com a ajuda das contrações uterinas, puxa seus filhotes para fora com os dentes. A rata então inicia um processo de limpeza dos filhotes, no qual ela ingere a placenta e limpa as membranas que os protegem. Lambendo seus filhotes, a mãe promove a respiração e atividade geral dos mesmos, e a amamentação inicia poucos minutos após a finalização do trabalho de parto e expulsão do último filhote. A busca de filhotes para o ninho é um dos comportamentos diretos mais estudados, sendo o momento em que, após a separação, a mãe cheira e busca todos os filhotes com a boca, agrupando-os no

ninho formado (LONSTEIN; FLEMING, 2001). Após o agrupamento dos filhotes em local determinado pela mãe como ninho, a rata passa a maior parte do seu tempo sobre seus filhotes, manifestando comportamentos como lambar e amamentar a prole. O ato da mãe lambar a região anogenital de seus filhotes expressa importantes aspectos motivacionais e imunológicos. Para a mãe é um mecanismo de recompensa, e para os filhotes, um estímulo crucial à sobrevivência nos primeiros dias de vida. Estudo publicado por Friedman e Bruno (1976) mostrou que a rata mãe é uma das fontes de reciclagem de água mais importantes da Natureza, pois ela consome em média 21 mL de água proveniente de excretas dos filhotes, produzindo 35 mL de leite com vitaminas, calorias e lipídeos, além de anticorpos extremamente específicos aos seus filhotes. Além de tudo, o ato da mãe lambar seus filhotes promove consequências comportamentais e imunológicas nos mesmos, quando analisados posteriormente na idade adulta. Pesquisas em ratos e em camundongos (DENENBERG; KARAS, 1959) mostram que breves momentos de separação materna (i.e., aproximadamente 15 minutos) resultam em uma diminuição da atividade da adrenal em resposta a agentes estressores quando a prole alcança a idade adulta.

Quando um número suficiente de filhotes está sendo amamentado, a rata passa de um estado ativo de amamentação para um estado quiescente, aonde o mecanismo de amamentação torna-se praticamente automático. A fêmea assume uma postura na qual sua coluna permanece arqueada em formato curvilíneo, com rigidez de membros posteriores. Essa postura denominada cifose fisiológica, faz com que haja uma completa exposição das mamas ao passo que há espaço suficiente para os filhotes respirarem e se moverem com relativa facilidade (STERN, 1996), sendo que durante os primeiros dias de lactação é bastante comum que a rata apresente tal postura (LONSTEIN; SIMMONS; STERN, 1998). Uma vez que a rata assume a posição de cifose, nosso grupo de estudos considera que permanecendo a fêmea durante no mínimo três minutos consecutivos, sobre no mínimo cinco filhotes, assume-se que esta mãe apresentou comportamento materno total (CMT) (CRUZ, 2009).

A construção do ninho é extremamente importante, pois neste local ocorrem as interações mãe-filhote mais importantes. Este ambiente não é importante apenas

para as interações, mas também para a termorregulação dos filhotes (LEON; WOODSIDE, 1983). Na Natureza, a mãe carrega todo o tipo de material que possa servir para formação de barreira de proteção contra possíveis predadores, tais como pedaços de gravetos e folhas, construindo uma estrutura normalmente com paredes compactas e uma depressão no centro, e no caso de roedores, preferencialmente em um local com baixa iluminação. Construção de ninho não é um comportamento exclusivo de mães, porém os ninhos construídos por elas costumam ser mais elaborados. Em ambiente experimental, a rata utiliza a maravalha e quaisquer outros materiais introduzidos para enriquecimento ambiental, tais como, algodão e pedaços de canos plásticos.

A fêmea lactante torna-se potencialmente mais agressiva contra possíveis agressores de sua prole. A agressão materna é uma forma de proteção da mãe ao seu bem mais precioso: a ninhada (LONSTEIN; GAMMIE, 2002).

O aumento da atividade exploratória da fêmea lactante, bem como o aumento de consumo de água e alimentos também estão associados ao período de lactação e tornam-se necessários pela alta demanda metabólica do processo de produção de leite (FLEMING, 1976).

Além disso, a mãe frequentemente expressa o comportamento de *self grooming* na região abdominal ventral, que aumenta no terço final da gestação e permanece até o final da lactação, auxiliando no desenvolvimento das glândulas mamárias, e consequentemente, em uma maior ejeção de leite. O comportamento de *self grooming* neste momento não pode ser considerado como comportamento materno direto, porque não é direcionado à prole (ROTH; ROSENBLATT, 1968).

Conforme os filhotes vão crescendo e tornando-se independentes, isto é, conseguem regular sua própria temperatura corpórea, ingerirem alimentos e urinar/defecar sem auxílio da mãe, gradativamente ela começa a diminuir os cuidados com a prole. Esse processo começa a ocorrer por volta do 18º dia, e a idade adequada para o desmame dos filhotes é por volta do 21º dia pós parto (NUMAN; FLEMING; LEVY, 2006).

1.1.1 Controle Hormonal

Os hormônios esteróides influenciam o comportamento animal, desenvolvimento folicular ovariano, maturação do oócito, ovulação, formação do corpo lúteo, manutenção da gestação, parto e lactação.

A rata em trabalho de parto consegue expressar o comportamento materno necessário para a sobrevivência da prole desde o momento do nascimento, e para que isso ocorra, há uma modulação do sistema endócrino da fêmea. Porém, uma vez que a indução hormonal do comportamento materno ocorre, sua expressão não requer a ação dos hormônios, ou seja, a ação hormonal é essencial para a indução, mas não para a manutenção do comportamento materno em ratas (NUMAN; FLEMING; LEVY, 2006).

O parto normalmente resulta de eventos hormonais sincronizados que culminam com a expulsão do feto. Quando a placenta é expulsa e a lactação inicia, ocorre o início de uma intensa ligação simbiótica entre a prole e a mãe, mediada fundamentalmente por hormônios (ROSENBLATT, 1975).

Os hormônios não são fundamentais para a indução e manutenção do comportamento materno, entretanto, muitos aspectos são facilitados pela ação hormonal. Rosenblatt et al. (1979) propuseram que embora o aparecimento do comportamento maternal seja mediado por hormônios em ratas, a manutenção do mesmo no período pós-parto não sofre influência hormonal tão intensa.

Fleming et al. (1989) verificaram que a administração de progesterona e estradiol produzia efeitos muito parecidos aos de sensibilização ao comportamento maternal em ratas virgens. Ratas virgens tratadas com hormônios se tornavam menos tímidas em um ambiente estranho que continha odores novos e passavam mais tempo próximas a um recipiente que continha maravalha proveniente de uma caixa com mãe e filhotes. Ou seja, o animal não foi repellido pelo odor da mãe e filhotes, ao contrário, sentiu-se atraído. Além disso, a sensibilização ao comportamento maternal produz efeitos por um tempo mais longo se a fêmea receber um tratamento com indução hormonal por estrógeno e progesterona (FLEMING; SARKER, 1990).

Durante a fase gestacional, os níveis séricos de estrogênios são geralmente baixos e bastante similares à fase de diestro até por volta do 16º dia de prenhez, quando gradualmente vão aumentando até o momento do parto. Com exceção de um pequeno aumento no momentos do estro pós-parto, os níveis séricos de estrogênios se mantêm relativamente baixos durante a maior parte do período de lactação, aumentando progressivamente por volta do 15º dia de lactação, e consistentemente próximo ao desmame (GARLAND et al., 1987).

O estradiol age perifericamente no útero e nas glândulas mamárias, e centralmente, modulando a circuitaria neural em relação à expressão do comportamento materno e aspectos motivacionais da rata. Em estudos de manipulação hormonal para análise da expressão do comportamento materno, o estradiol foi capaz de promover a indução deste comportamento mais rapidamente (ROSENBLATT; WAGNER; MORRELL, 1994).

Os hormônios circulantes certamente regulam os receptores centrais de estrogênios e progestrogênios. A região específica de regulação destes receptores em sistema nervoso central (SNC) pode envolver a modulação adicional de certos neurotransmissores (MORRELL et al., 1995).

Os níveis séricos de progesterona se mantêm altos a partir do 5º dia de prenhez, e começam a reduzir drasticamente por volta do 19º dia gestacional, apresentando níveis quase indetectáveis durante o momento do parto (ROSENBLATT; WAGNER; MORRELL, 1994; SANYAL, 1978). Durante o período de lactação, os níveis séricos de progesterona aumentam gradativamente durante os primeiros cinco dias de lactação, sendo que o pico deste hormônio para o período é por volta do 10º dia, caindo a níveis extremamente baixos por volta do desmame (TAYA; GREENWALD, 1982). Assim como a manutenção dos níveis séricos de progesterona durante a gestação é essencial para a manutenção da mesma, a diminuição dos níveis séricos deste hormônio também é fundamental para o início da expressão do comportamento materno (ROSENBLATT, 1979). Os mecanismos pelos quais a progesterona inibe a expressão do comportamento materno durante o período pré-parto, e permite que o mesmo se expresse no período pós-parto, não foram claramente elucidados por estudos da literatura.

1.1.2 Sensibilização Comportamental e Farmacológica

Fêmeas virgens, machos e até mesmo ratos em idade juvenil podem ser induzidos a expressar alguns tipos de comportamento materno por meio da exposição contínua aos filhotes. Tal fenômeno é amplamente conhecido na literatura como sensibilização comportamental. A contínua exposição a filhotes pode induzir mudanças hormonais em fêmeas virgens (SHEEHAN et al., 2000). Ratas virgens expostas a filhotes por um período de 12 dias consecutivos apresentam uma resposta de liberação de prolactina similar a de fêmeas lactantes, sendo que a resposta é maior em fêmeas que receberam injeções combinadas dos hormônios estrógeno e progesterona (SAMUELS; BRIDGES, 1983).

A sensibilização farmacológica pode ser definida como o aumento de um efeito comportamental de determinadas drogas, após um período prolongado de administração seguido por um período de abstinência. Para fins didáticos, preferencialmente utilizamos o termo “tolerância reversa” para descrever este fenômeno e para que não haja confusão com o termo “sensibilização comportamental” anteriormente descrito (CRUZ, 2009).

Estudos envolvendo o comportamento maternal e drogas de abuso são importantes para entender o mecanismo de dependência a drogas em mães e descobrir possíveis tratamentos para síndromes que promovem alterações comportamentais em gestantes e mães.

Doses não sedativas de morfina inibem o comportamento materno, ao mesmo tempo que seu antagonista farmacológico naloxona restabelece a resposta materna em ratas lactantes (BRIDGES; GRIMM, 1982; MIRANDA-PAIVA et al., 2001; SUKIKARA et al., 2007; FELICIO; CANTERAS, 2008).

A injeção de beta endorfina tanto no ventrículo lateral como na área pré-óptica medial (MPOA) de ratas lactantes inibe o comportamento materno de maneira dose dependente, sugerindo que alterações nos níveis de opióides endógenos alteram a resposta da mãe aos seus filhotes (FELICIO; MANN; BRIDGES, 1991; MANN; FELICIO; BRIDGES, 1995).

Pesquisas recentes do nosso grupo de estudos e de outros grupos sugerem que alterações no tônus opioidérgico decorridas no terço final da gestação podem

modular a expressão de padrões comportamentais no pós-parto. O comportamento materno pode ser inibido após a administração de baixas doses de morfina durante a gestação, porém isso não ocorre quando a morfina é aplicada antes do período gestacional. Ratas testadas exclusivamente com filhotes e desafiadas agudamente com 5,0 mg/Kg de morfina, tiveram o comportamento materno inibido. A dose de 3,0 mg/Kg não foi suficiente para inibir estes parâmetros, exceto em ratas que foram desafiadas com morfina durante a lactação (MIRANDA-PAIVA et al., 2001, 2003, 2007; ŠLAMBEROVÁ; SZILÁGYI; VATHY, 2001; YIM et al., 2006).

Trabalhos realizados em nosso laboratório com ratas tratadas com injeções diárias de morfina dos dias 17 a 21 de prenhez e sacrificadas trinta minutos após a injeção, demonstraram um aumento significativo nos níveis de progesterona em animais previamente tratados com morfina em todos os dias de tratamento. Assim, o estudo revelou uma ação específica da morfina sobre a liberação de progesterona ao final da gestação com possíveis consequências comportamentais (SUKIKARA et al., 2011).

1.1.3 Ação da Colecistocinina (CCK) no Comportamento

A colecistocinina (CCK) é um hormônio gastrointestinal que pode atuar como neurotransmissor e neuromodulador. Ela é distribuída de forma abundante no SNC e no intestino, sendo considerada um dos peptídeos presentes de forma mais abundante no cérebro, particularmente nas regiões do córtex, estriado e hipocampo (MUTT, 1994). A CCK age modulando comportamentos reprodutivos, na termorregulação, na modulação cardiovascular, analgesia, aprendizado e memória, saciedade, ansiedade e em grande parte de distúrbios psiquiátricos e neurológicos com envolvimento de neurotransmissão dopaminérgica (CRAWLEY; CORWIN, 1994). A função fisiológica da CCK mais clássica e bem descrita na literatura é a indução de saciedade (COOPER; DOURISH, 1990; CRAWLEY, 1991).

Os receptores de CCK foram inicialmente denominados de CCK_A e CCK_B sendo “A” para *alimentary* (alimentar) e “B” para *brain* (cérebro) (MORAN et al., 1986; NOBLE et al., 1999). O receptor para CCK_A foi descoberto primeiramente em

ácinos pancreáticos de roedores, e os receptores de CCK_B primariamente encontrados em encéfalo. De acordo com as recomendações da *International Union of Pharmacology* (IUPHAR), tais receptores foram renomeados, passando o receptor CCK_A a ser denominado CCK₁ e o receptor CCK_B a ser denominado CCK₂ (NOBLE et al., 1999).

A CCK é liberada nas ratas lactantes em resposta ao estímulo de sucção juntamente com outros peptídeos como prolactina e ocitocina (HOLST et al., 1986; LINDÉN et al., 1990; LUPOLI et al., 2001). Entretanto o papel da administração exógena de CCK na indução do comportamento materno precisa ser pesquisada mais detalhadamente. Durante a prenhez os níveis séricos de CCK aumentam ajudando a otimizar o processo digestivo, e possivelmente atuando também no SNC facilitando a expressão do comportamento materno (LINDÉN et al., 1989, 1990; MANN; FELICIO; BRIDGES, 1995).

A ação da CCK na modulação do comportamento materno parece estar associada ao estado reprodutivo da fêmea e ação em sítios neuroanatômicos específicos. Após injeções intracerebroventriculares (ICV) crônicas de CCK-8s, a indução do comportamento materno não foi alterada em fêmeas de ratas virgens previamente tratadas com hormônios esteroidais, porém o mesmo estudo demonstrou que a injeção de CCK-8s na MPOA de ratas lactantes preveniu a ação inibitória da beta endorfina no comportamento materno (MANN; FELICIO; BRIDGES, 1995).

Antagonistas de receptores de CCK potencializam a ação dos opióides em vários parâmetros fisiológicos e comportamentais (WATKINS; KINSHECK; MAYER, 1985). A CCK age como antagonista na analgesia promovida pelos opióides (FARIS et al., 1983; REZAYAT; RAHNAVARD; ZARRINDAST, 2000). O pré-tratamento com antagonista de CCK no período final da gestação aumenta os efeitos inibitórios dos opióide no comportamento materno (MIRANDA-PAIVA et al., 2003), de modo que CCK e morfina agem de maneira antagonista na modulação do comportamento materno em ratas lactantes. Tal controle parece ser plástico e adaptativo e pode ser importante na otimização da modulação comportamental durante a lactação.

O proglumide, um antagonista não específico de CCK, aumenta as latências para a busca de filhotes e para aumento da expressão da posição de amamentação

em ratas lactantes, quando administrado central ou perifericamente (MANN; FELICIO; BRIDGES, 1995). Injeções centrais de CCK na substância cinzenta periaquedutal (PAG) são capazes de restabelecer a responsividade materna em fêmeas previamente sensibilizadas com morfina, um fármaco que sabidamente age diminuindo a expressão do comportamento materno em diversos paradigmas. Por outro lado, injeções subcutâneas de antagonistas seletivos para ambos os subtipos de receptores de CCK aumentam os efeitos inibitórios da morfina no CM de ratas lactantes (MIRANDA-PAIVA; FELICIO, 1999).

1.1.4 Controle Neural e Motivacional

Os hormônios, em sua grande maioria, possuem ação periférica em estruturas alvo na facilitação ou inibição da expressão de determinados comportamentos. Porém, vale lembrar que em certos casos a fonte primária desses hormônios é no SNC ou através da interação dos mesmos com receptores centrais específicos.

O sítio neuroanatômico mais estudado na expressão do comportamento materno é a área pré-óptica medial (MPOA). Lesões na MPOA durante os períodos pré e pós-parto inibem de maneira drástica a expressão do comportamento materno, particularmente em relação aos comportamentos de busca de filhotes e construção de ninho (NUMAN; INSEL, 2003). A MPOA faz parte do que se entende como área locomotora pré-óptica/hipotalâmica, uma região sensível à ação dos estrogênios (TAKEO; SAKUMA, 1995), que projeta para regiões sub-talâmicas e para o núcleo pedunculopontino do mesencéfalo, estruturas sabidamente envolvidas na locomoção (SWANSON et al., 1987). Tais projeções da MPOA são necessárias para o controle motor do comportamento materno. Ainda é importante salientar que a MPOA é altamente sensível a uma grande variedade de hormônios, sendo referenciada como um local de integração entre os sistemas endócrino, motor e sensorial da fêmea para a performance do comportamento materno (LONSTEIN; MORRELL, 2007).

O núcleo do leito da estria terminal (BST) encontra-se muito próximo à região da MPOA, sendo inclusive considerado por alguns autores uma região com

propriedades únicas quando falamos da porção ventral do BST (vBST). O BST é responsável pela expressão de vários comportamentos sociais em animais devido a sua capacidade de transmitir informações entre a amígdala e o hipotálamo. Lesões neurotóxicas no vBST promovem prejuízo nos parâmetros de busca de filhotes e construção de ninho, com resultados bastante similares às lesões em MPOA (NUMAN, 1996).

O envolvimento da PAG no comportamento materno tem sido pouco estudado. Algumas pesquisas mostram que a expressão desse comportamento mobiliza a porção ventro-dorsal da porção caudal da PAG. Essa região neuroanatômica seria responsável pela modulação do comportamento de cifose fisiológica induzida pela amamentação dos filhotes, bem como possuiria um papel no comportamento agressivo da fêmea lactante (LONSTEIN; STERN, 1997, 1998). A MPOA envia projeções para a PAG e alguns autores consideram que aquelas áreas inervadas pelas eferências laterais da área pré-óptica medial, como a PAG, também desempenham importante papel nesse comportamento e, devem, portanto, constituir relevante fonte de pesquisa para a determinação do significado funcional dessas conexões (MOTA-ORTIZ et al., 2009).

Nas fêmeas, a PAG parece ser modulada pela variação nos níveis séricos de esteróides em decorrência de mudanças hormonais geradas durante o ciclo estral. A natureza lipofílica dessas moléculas hormonais garante seu acesso rápido ao cérebro através da circulação sanguínea (PAUL; PURDY, 1992).

Muitos estudos têm sido feitos para analisar o aspecto motivacional da mãe quando se diz respeito aos cuidados com seus filhotes em diversos paradigmas, como a busca de filhotes em labirinto em T (BRIDGES et al., 1972), preferência entre filhotes e drogas que agem em sistema de recompensa como a cocaína (MATTSON et al., 2001, 2003), testes em que ao pressionar um sistema de barras a fêmea ganha um filhote como recompensa (HAUSER; GANDELMAN, 1985), sendo que invariavelmente a preferência das mães é pelos seus filhotes. Fêmeas que apresentam preferência por filhotes apresentam maior número de neurônios reativos à proteína c-Fos (OLAZÁBAL; MORRELL, 2005). Ao que parece, em muitos paradigmas, a ação hormonal tem papel fundamental no estado motivacional da mãe. Os hormônios da gestação são importantes na escolha das mães para a preferência de câmara associada a filhotes, sendo que fenômeno similar ocorre em

fêmeas virgens que receberam tratamento com estrógeno e progesterona simulando as variações hormonais das mães (FLEMING et al., 1994).

1.1.5 Experiência Reprodutiva

Sabe-se que a experiência reprodutiva (ER) pode modular uma série de eventos fisiológicos na fêmea ao longo de sua vida. Nosso grupo e outros vêm estudando fenômenos que diferenciam as fêmeas multíparas, ou seja, que apresentaram mais de um parto com lactação, de fêmeas nulíparas (virgens) ou primíparas, que apresentaram apenas um único parto.

Os fenômenos que envolvem gestação, parto e lactação comprovadamente modulam a função neural e os comportamentos não relacionados apenas aos cuidados maternos (MACBETH; LUINE, 2010). Há um envolvimento cognitivo, afetivo e de respostas ao estresse. Fêmeas primíparas e multíparas apresentam uma grande resistência a agentes estressores (WARTELLA et al., 2003), diminuição da ansiedade (LONSTEIN, 2005; PEREIRA et al., 2005), melhores desempenhos de aprendizado e memória quando comparadas à ratas virgens ou nulíparas (PAWLUSKI; GALEA, 2006; DARNAUDÉRY et al., 2007). Além disso, outros estudos revelam que tais modificações podem durar além do período de lactação, inclusive permanecendo até a idade avançada destas fêmeas (GATEWOOD et al., 2005; PAWLUSKI; GALEA, 2006, 2007; BYRNES et al., 2007; MACBETH; GAUTREAUX; LUINE, 2008).

O sistema imunológico de ratas multíparas parece ser mais efetivo mediante a modulação farmacológica (CARVALHO-FREITAS et al., 2007, 2011), bem como pode influenciar diretamente na modulação de alguns tipos de comportamento como o *self grooming* (SERAFIM; FELICIO, 2002), atividade exploratória, comportamentos estereotipados (HUCKE et al., 1998, 2001) e caça predatória (SUKIKARA, 2006).

Pesquisas em seres humanos e animais demonstram que há uma série de benefícios em tornar-se mãe. Gestação e maternidade comprovadamente influenciam em diversos mecanismos que necessitam serem melhor estudados para

o descobrimento de novos tratamentos principalmente no que se refere a distúrbios de humor e déficit de cognição relacionados à idade em mulheres.

1.1.6 Ansiedade Materna

O evento de tornar-se mãe é considerado pela grande maioria das mulheres uma das experiências mais gratificantes e recompensadoras que um ser humano pode vivenciar, sendo que a maioria das mulheres apresentam aumento nos níveis de estabilidade emocional e sentimentos positivos, incluindo diminuição nos níveis de ansiedade (FLEMING; SARKER, 1990; ALTSHULER; HENDRICK; COHEN, 2000; BREITKOPF et al., 2006).

Por outro lado, muitas mães no período pós-parto apresentam um quadro de desequilíbrio emocional, sendo a ansiedade frequentemente envolvida, muitas vezes com a manifestação de um sentimento de que a mãe não se sente preparada para assumir as responsabilidades da nova fase de vida (LONSTEIN, 2007). Diversos mecanismos podem estar envolvidos no quadro de ansiedade materna, tais como fatores neuroendócrinos, sócio-econômicos, afetivos/emocionais. As vias neuror anatômicas envolvidas na ansiedade materna ainda não foram perfeitamente elucidadas.

Assim como ocorre na maioria das mulheres, ratas também apresentam diminuição nos níveis de comportamento similar à ansiedade no pós-parto quando comparadas às ratas virgens. Tal diminuição nos níveis deste comportamento pode influenciar diretamente na habilidade das ratas mães cuidarem de sua prole (FLEMING; LUEBKE, 1981; HARD; HANSEN, 1985).

A região do BST tem sido associada na literatura ao controle de determinados comportamentos “emocionais” em mamíferos, incluindo primatas humanos e não humanos (KALIN et al., 2005). Estudos em ratos de laboratório revelam que o BST esta envolvido na produção de respostas relacionadas à ansiedade em estímulos de ameaça ao animal, sendo tais respostas não condicionadas, difusas e duradoras (WALKER; TOUFEXIS; DAVIS, 2003). Lesões no BST podem promover efeitos

ansiolíticos em alguns paradigmas comportamentais, dependendo da porção do núcleo que foi lesionada (LEE; DAVIS, 1997). O BST é uma estrutura heterogênea que é composta por mais de 20 sub-regiões com características morfológicas, neuroquímicas e neuroanatômicas distintas (DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001; DONG; SWANSON, 2004, 2006). Devido ao grande número de sub-regiões e ao fato de alguns sub-núcleos serem extremamente pequenos ou de formato irregular, não existe na literatura um estudo detalhado da relação de cada sub-região com respostas diretas sobre a ansiedade. A maioria dos estudos envolve o BST como um todo. Alguns trabalhos relatam o vBST como sendo parte integrante da MPOA, região neuroanatômica amplamente estudada por sua modulação direta no comportamento materno (NUMAN, 1996).

A estimulação elétrica no BST ou a inibição no tônus GABAérgico aumenta a ansiedade (CASADA; DAFNY, 1993). Apesar de muitos estudos demonstrarem que o BST pode muitas vezes suprimir respostas relacionadas à ansiedade, existem poucos relatos na literatura demonstrando que manipulações neste núcleo não apresentam efeitos significativos em comportamentos similares à ansiedade. Um dos fatores cruciais é que os estudos na literatura possuem diferentes regiões do BST marcadas.

A maioria dos experimentos envolvem lesões de tamanhos variados no BST, muitas vezes a lesão ocorre no núcleo inteiro. Outro fator limitante seria a grande variedade de comportamentos analisados para avaliar como o BST modula a ansiedade (labirinto em cruz elevado, campo aberto, teste de preferência, comportamentos induzidos pelo estresse, dentre outros), bem como o uso de lesões eletrolíticas que destroem as vias de passagem *versus* lesões químicas que não alteram as fibras.

O Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) é um neuropeptídeo que pertence à família da Calcitonina. Duas isoformas deste peptídeo, codificadas por diferentes genes e diferenciadas apenas por um único aminoácido foram identificadas no rato de laboratório: a isoforma α , que é predominante no tecido nervoso, e a isoforma β (AMARA et al., 1982; ROSENFELD et al., 1983). A ativação do receptor do CGRP desencadeia sinais para a proteína G, levando ao aumento intracelular nos níveis de cAMP (POYNER, 1992), resultando na liberação de cálcio proveniente das reservas intracelulares (AIYAR et al., 1996; MAZZOCCHI et al.,

1996). Além da ação em seus próprios receptores, o CGRP ainda possui ação como neuromodulador da transmissão colinérgica, modificando a excitabilidade dos receptores nicotínicos e de acetilcolina de diversas formas dependendo da célula alvo (MULLE et al., 1988; LU et al., 1993; DI ANGELANTONIO et al., 2003).

O CGRP está relacionado à uma grande variedade de respostas fisiológicas. Apesar da grande distribuição deste peptídeo em SNC (SEIFERT et al., 1985; SKOFITSCH; JACOBOWITZ, 1985), pouco se sabe sobre a ação do CGRP na modulação comportamental. O CGRP produz efeito analgésico prolongado (PECILE et al., 1987), possui ação anorexígena em animais em privação alimentar (KRAHN et al., 1984), diminui o apetite, a secreção gástrica e inibe o esvaziamento gástrico (LENZ et al., 1985). Causa hipertermia em roedores (JOLICOEUR et al., 1992). Diminui a atividade motora, aumenta frequência de *rearing* (KOVÁCS et al., 1999) e causa catalepsia, sugerindo uma possível interação com neurônios dopaminérgicos (CLEMENTI et al., 1992; JOLICOEUR et al., 1992), age retardando a extinção da resposta de esquiva ativa (KOVÁCS; TELEGDY, 1994b), aumenta o aprendizado e a consolidação da memória de forma dose-dependente em testes de esquiva passiva (KOVÁCS; TELEGDY, 1992), previne a amnesia retrógrada induzida por choque eletroconvulsivo (KOVÁCS; TELEGDY, 1994a), aumenta o número de batimento cardíacos e a pressão arterial sanguínea (BROWN; GRAY, 1988) bem como a ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário (KOVÁCS et al., 1995; LI et al., 2004).

Em ratos Sprague Dawley machos, foi comprovada a ação ansiogênica do CGRP de forma dose-dependente, tanto no teste de labirinto em cruz elevado (LCE) quanto no teste de reflexo acústico, sendo que o antagonista farmacológico α -CGRP foi capaz de reverter o efeito ansiogênico do CGRP quando administrado centralmente no vBST (SINK et al., 2011).

1.2 COMPORTAMENTO PREDATÓRIO: DEFINIÇÃO E CONCEITOS

No ambiente natural, os animais frequentemente se deparam com situações de conflito, e devem fazer escolhas entre diversos comportamentos fundamentais

para sua manutenção, tais como alimentação, defesa e reprodução (SUKIKARA et al., 2010).

A caça predatória é uma resposta comportamental inata crítica para a sobrevivência dos animais. Para estudos de predação em ratos, os insetos são utilizados frequentemente, sendo a barata um dos insetos mais utilizados (COMOLI; RIBEIRO-BARBOSA; CANTERAS, 2003; SUKIKARA et al., 2006; SUKIKARA et al., 2007; CRUZ, 2009; CRUZ et al., 2010; KLEIN, 2012).

1.2.1 Controle Neural e Motivacional

Em roedores, o padrão de ativação da PAG durante a inibição opioidérgica do comportamento maternal é muito similar ao apresentado durante o forrageamento (COMOLI; RIBEIRO-BARBOSA; CANTERAS, 2003; MIRANDA-PAIVA et al., 2003).

A caça predatória pode aumentar de maneira dose-dependente ao passo que os cuidados maternos diminuem, com a administração de diferentes doses desafio de morfina durante a lactação, em ratas previamente tratadas com morfina no terço final da gestação (CRUZ et al., 2010).

De maneira similar ao que ocorre com o BST, a PAG pode ser dividida em várias porções, sendo que cada parte da estrutura age de uma forma diferenciada influenciando comportamentos distintos. A PAG está relacionada a vários processos comportamentais e fisiológicos, tais como antinocicepção, o medo e a ansiedade, a regulação autonômica, a vocalização, o comportamento de defesa ativa ou quiescente, a luta ou a fuga, a geração e elaboração de resposta de defesa de medo evocado, o comportamento de caça predatória, o comportamento aversivo, o comportamento de acasalamento e receptividade sexual, o controle da micção, a lordose sexual, e o gerenciamento de estratégias ativas (LOVICK; ADAMEC, 2009). Recentemente, a PAG foi relacionada à seleção de respostas comportamentais adaptativas (SUKIKARA et al., 2007).

Estudos combinando o uso de técnicas imunoistoquímicas e farmacológicas são de grande importância para elucidar o real papel da região rostro-lateral da PAG

(PAGrl) na seleção comportamental após o parto em ratas. É importante que se conheça exatamente como funciona tal modulação uma vez que, na natureza, processos reprodutivos bem sucedidos correspondem à manutenção e preservação de determinada espécie. Trabalho publicado pelo nosso grupo sustenta a primeira evidência para uma função anteriormente desconhecida da PAG como um centro para seleção de respostas comportamentais adaptativas (SUKIKARA et al., 2006).

1.2.2 Modulação Comportamental

Entende-se como modulação (ou seleção) comportamental o ato do animal escolher entre dois ou mais tipos de comportamentos. A expressão de um deles deve ser interpretada num contexto de valor adaptativo, baseando-se para tal no que é mais importante e necessário no momento da escolha.

Após o parto, toda mãe tem que manter um balanço entre sua própria sobrevivência e a sobrevivência de sua prole. Deverá haver um equilíbrio entre subsistência e reprodução, visto que ambos exigem um grande gasto de energia por parte de mãe. Assim como o processo de seleção natural favorece os animais reprodutivamente competentes, também irá favorecer aqueles que cuidam adequadamente de seus filhotes e sabem balancear o uso do tempo entre cuidados maternos e atividades que envolvam a própria sobrevivência (HRDY; 1999, 2011; FELICIO; CANTERAS, 2008).

Ajustes nas variações funcionais de vias endógenas são fundamentais para a promoção do balanço entre cuidados maternos e ir em busca de alimento (FELICIO; CANTERAS, 2008).

A análise do comportamento predatório de ratos tendo insetos como presa tem se revelado um modelo interessante para a investigação neuroetológica desses sistemas. Anteriormente já havia sido utilizado o modelo de predação em ratos tendo o camundongo como presa (CHAURAND; VERGNES; KARLI, 1972), o que pode promover sentimento aversivo por parte do experimentador. A utilização de baratas do gênero *Picnocellus surinamensis* proporcionou um bom modelo para a utilização em nossos estudos, por ser um inseto inofensivo e os ratos demonstrarem grande

motivação para seu consumo. Mesmo sem restrição alimentar, a exposição às baratas desperta o comportamento de caça predatória em ratos.

Recentemente Klein (2012) relatou os efeitos de antagonistas e agonistas opióides seletivos na modulação comportamental, descobrindo importante papel do receptor opióide μ na manutenção do tônus opioidérgico endógeno de estímulo à caça predatória.

A caça predatória pode aumentar de maneira dose-dependente ao passo que os cuidados maternos diminuem com a administração de diferentes doses desafio de morfina durante a lactação em ratas que receberam estímulo opioidérgico no terço final de gestação. Os mecanismos envolvidos nesse paradigma parecem ser plásticos e adaptativos (CRUZ et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar por meio de testes comportamentais, fenômenos que envolvem motivação e ansiedade em ratas lactantes, mediante manipulações ambientais e farmacológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a influência do estímulo ambiental básico na expressão do comportamento materno através de diferentes desafios.

Avaliar o efeito da injeção periférica de progesterona na seleção entre comportamentos materno e predatório em ratas lactantes, bem como sua possível interação farmacológica com o sulfato de morfina.

Avaliar o efeito da injeção central aguda de progesterona e de seu antagonista farmacológico, mifepristona, na PAGrl no comportamento de ratas lactantes, verificando a preferência das fêmeas em relação a expressão do comportamento materno ou predatório.

Avaliar o efeito do antagonista não seletivo de CCK, proglumide, na seleção comportamental em ratas lactantes.

Avaliar o efeito do antagonista não seletivo de CCK, proglumide, no comportamento predatório de ratas em diferentes estados reprodutivos.

Avaliar a ação do CGRP e de seu antagonista farmacológico α -CGRP em estrutura sabidamente responsável pela modulação de comportamento do tipo ansiedade e estresse, o vBST, em fêmeas lactantes.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para os Experimentos 1 a 5, foram utilizados como sujeitos experimentais ratas virgens (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, com aproximadamente 90 dias de idade, e ratos machos sexualmente experientes para acasalamento, com idades variando entre 100 e 180 dias, obtidos 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. Estes experimentos foram aprovados pela comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sendo protocolados sob os números 1193/2007, 1760/2009 e 2797/2012.

Para a realização do Experimento 6 os sujeitos experimentais utilizados foram ratas virgens da linhagem Long-Evans, com aproximadamente 90 dias de idade e ratos machos sexualmente experientes para acasalamento, com idades variando entre 100 e 180 dias, nascidos em colônia própria mantida no Biotério do Programa de Neurociência da Michigan State University (East Lansing, MI, Estados Unidos). Matrizes eram provenientes da empresa Harlam (Indianapolis, IN, Estados Unidos), local aonde era feito o controle genético dos animais. Os animais eram mantidos em caixas de polipropileno transparente, medindo 48X28X16 cm, forradas com maravalha de flocos médios. Permaneciam em salas com sistema de ventilação ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz de 12 h claro e escuro, (07h00 – 19h00) Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas do *National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e do *Institutional Animal Care and Use Committee* da Michigan State University.

3.1.1 Acasalamentos e Padronização da Ninhada

Para a realização dos Experimentos de 1 a 5, 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. No início do período claro do dia seguinte foi realizada a análise de citologia vaginal para confirmar a presença de espermatozoides, considerando este o dia 1 da prenhez. As ratas foram mantidas individualmente até o momento do parto. Os partos foram monitorados diariamente até às 14h00, sendo os partos ocorridos após este horário considerados como tendo ocorrido no dia posterior. No dia 3 de nascimento foram realizadas a contagem e sexagem dos filhotes, de modo que permaneceram quatro machos e quatro fêmeas por mãe sempre que possível, nos animais utilizados para experimentos que envolviam a análise de comportamento materno.

Para a realização do Experimento 6, após o desmame aos 21 dias de idade, as fêmeas eram alojadas em caixas moradia descritas anteriormente em grupos de 2 a 3 fêmeas por caixa. A partir dos 75 dias de idade, começavam a ser monitoradas diariamente para avaliação do ciclo estral. O ciclo estral era avaliado por volta de 15h00 com o auxílio de um aparelho que mede mudanças de corrente elétrica e pH na parede interna da vagina ao longo do ciclo, para fins didáticos chamaremos este aparelho como “Medidor de Ciclo Estral” (Impedance Meter®, Fine Science Tools, Foster City, CA, EUA). Fêmeas detectadas no proestro eram colocadas na caixa moradia de um macho sexualmente experiente por volta de 16h00. Na manhã do dia seguinte, por volta de 10h00, as fêmeas eram examinadas observando-se a presença de um *plug* copulatório na vagina da fêmea, o que indicava o sucesso do acasalamento. Fêmeas que não apresentavam o *plug* vaginal eram submetidas à realização de exame de citologia para confirmar a presença ou ausência de espermatozoides. Após o diagnóstico de prenhez, fêmeas gestantes eram colocadas na mesma caixa moradia em grupos de 2-3 fêmeas por caixa, até o dia da realização do procedimento de cirurgia para implantação da cânula guia. Neste dia, as fêmeas eram colocadas em caixas moradia limpas e individualizadas. No dia 3 de lactação

foram realizadas a contagem e sexagem dos filhotes, de modo que permaneceram quatro machos e quatro fêmeas por mãe sempre que possível

3.1.2 Habituação

Com a finalidade de promover a habituação do animal ao aparato experimental e à sala aonde o teste comportamental era realizado, 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. O tempo de habituação foi igual ao tempo de observação no dia do teste, ou seja, de 30 ou 45 minutos. Ratas lactantes eram habituadas nos dias 3 e 4 de lactação, ratas virgens eram habituadas um dia antes do teste comportamental, e ratas prenhes eram habituadas nos dias 16 e 17 de prenhez. A habituação promove o condicionamento do animal, tornando a sensação de “novidade” bastante diminuída ou ausente. Nos experimentos envolvendo análise de comportamento do tipo ansiedade em LCE, não foi feita a habituação do animal ao aparato experimental.

Um dia antes da realização do teste comportamental, os animais foram manuseados e habituados ao procedimento de injeção de drogas. Essa habituação foi feita da seguinte maneira: as fêmeas eram removidas de suas gaiolas moradia e levadas para a sala de testes comportamentais, colocadas em uma caixa limpa com 30% da maravilha habitual, sem a presença dos filhotes. A seguir, o capacete de silicone e a cânula mandril eram removidos da cânula guia. Era feita a limpeza da região, com *swab* embebido em Álcool 70%. A cânula injetora de 28-gauge era inserida através da cânula guia, mas nada era injetado. Isso foi feito com o objetivo de familiarizar o animal ao procedimento a ser realizado no dia seguinte. A cânula injetora era deixada no local durante 2 minutos. Após a remoção da cânula injetora era feita a limpeza do local com *swab* embebido em Álcool 70%, e a cânula mandril e o capacete de silicone reposicionados no local de origem. Após a manipulação das cânulas, a rata permanecia na sala de comportamento em sua gaiola moradia durante 15 minutos, em ambiente simulando o do dia do teste comportamental. Após os 15 minutos de ambientação, os filhotes retornavam para a gaiola moradia, e

todos eram levados juntos ao Biotério. A limpeza das gaiolas moradia era constantemente monitorada, de modo que não eram realizadas limpezas em dias específicos que poderiam alterar o comportamento das mães. Por exemplo, as limpezas não eram feitas 2 dias antes da previsão do parto da rata, bem como 2 dias depois. Dois dias após o parto, as gaiolas eram limpas e era feita a padronização da ninhada, de modo que permaneciam com a mãe apenas 8 filhotes, sendo 4 machos e 4 fêmeas. Além disso, não eram feitas limpezas nas gaiolas 48 horas antes da realização dos testes comportamentais.

3.1.3 Cirurgia Estereotóxica

Para a realização do Experimento 3, fêmeas gestantes foram anestesiadas entre os dias 15 e 17 de prenhez, via intraperitoneal, com uma mistura de quetamina (50 mg/Kg - Vetanarcol®, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e xilazina (5 mg/Kg - Kensol® Santana de Parnaíba, SP, Brasil). Logo após a injeção do anestésico, receberam por via subcutânea em dose única o analgésico dipirona sódica, na dose de 30 mg/Kg pré-operatório. Cada fêmea então foi colocada individualmente em um aparelho estereotático específico para ratos (*Kopf Instrument – Model 900*, Tujunga, CA, USA). Foi padronizado sempre efetuar a implantação da cânula guia do lado direito do cérebro, unilateralmente (*Plastics One Inc.*, Roanoke, VI, USA) na PAGrl. As medidas para a realização da cirurgia foram tomadas com base no bregma sobre a linha média da região rostral da calota craniana da rata. Uma vez tomada essa medida, foi definida a localização da cânula utilizando-se as seguintes coordenadas, de acordo com Paxinos e Watson (1998): anteroposterior = -6,0 mm a partir do bregma; médio-lateral = -0,6 mm a partir da linha média do seio sagital; dorso ventral = -4,2 mm de profundidade de implantação.

Por meio de broca odontológica foram realizadas quatro orifícios na calota craniana, uma profunda para a introdução da cânula guia e outras duas superficiais para ancorar os três parafusos de sustentação. Cânula e parafusos foram fixados com o auxílio de resina acrílica odontológica auto-polimerizante JET (Clássico®,

Campo Limpo Paulista, SP, Brasil). Ao término da cirurgia, a pele das ratas foi suturada com pontos cirúrgicos simples separados e fio nylon 3-0 suturadas, e no local da incisão foi aplicada a pomada de neomicina e bacitracina (Medley®, Campinas, Brasil). As ratas foram mantidas em local aquecido até se recuperarem por completo do procedimento cirúrgico e anestésico. Foi ainda administrado o analgésico paracetamol (Medley®, Campinas, Brasil) na água do bebedouro dos animais para minimizar a dor no período pós-operatório durante dois dias consecutivos. Os animais continuaram sendo mantidos individualmente nas gaiolas moradia após o procedimento cirúrgico, e eram monitorados diariamente, verificando estado geral da recuperação cirúrgica, se estavam se alimentando e bebendo água normalmente, bem como parâmetros de atividade geral.

No dia do teste, o uso de uma agulha injetora 1 mm mais longa do que a cânula guia permitiu que as injeções fossem feitas na região anatômica de escolha (PAGrl) com grande precisão, sem lesionar outras regiões anatômicas adjacentes.

Para a realização do Experimento 6, entre os dias 15 e 17 de gestação, as ratas foram submetidas à cirurgia para a implantação da cânula guia bilateral. Para tal eram anestesiadas com 90 mg/kg de Ketamina IP (Ketathesia®) e 4 mg/kg de Xilazina IM (Butler, Dublin, OH, EUA). Foi administrado o analgésico Buprenorfina na dose de 0,015 mg/kg IP (Reckitt Benckiser, Parsippany, NJ, EUA) 10 minutos antes do início do procedimento cirúrgico e a cada 8 horas, durante 2 dias após o procedimento, para promover analgesia adequada.

Quando o animal estava em plano anestésico adequado, era feita a tricotomia da parte dorsal da cabeça utilizando máquina de tosa (Wahl®, Sterling, IL, EUA). Após a tricotomia, foi feita a antissepsia do local com lenços umedecidos em Álcool 70% (Alcohol Prepared Pads Webcool Kendall®, Mansfield, MA, EUA), seguido por Clorexidina 2% (Novalsan®, Fort Dodge, IA, EUA). Os animais foram colocados no aparato de cirurgia Estereotática (Kopf Stereotaxic Instrument®, Tujunga, CA, EUA) e foi feita a injeção subcutânea de 0,1 ml de Lidocaína 4% (Roxane Laboratories Inc., Columbus, OH, EUA) ao longo da linha de incisão. Após checar se o animal estava sem sensibilidade dolorosa, era feita uma incisão de aproximadamente 1,5 cm seguindo o plano sagital mediano, sendo a pele afastada com o auxílio de um blefarostato. Foi feita a trepanação no local utilizando uma micro-furadeira de alta velocidade. As coordenadas estereotáticas para o alcance

da região neuroanatômica estudada vBST foram: antero-posterior -0,30 em relação ao Bregma; médio-lateral $\pm 1,2$ em relação ao Bregma. A cânula era cortada com a medida dorso-ventral (DV) de 6,8 mm, visto que a agulha injetora possuía 1 mm a mais do que a cânula guia, para atingir precisamente a coordenada DV de 7,8 mm. A cânula guia foi então fixada ao perióstio do animal com o auxílio de 3 parafusos extras alinhados de maneira a formar um quadrado com a cânula guia, e fixados com o auxílio de cimento dental. Após a fixação, a cânula guia recebia uma tampa composta por uma cânula mandril e um capacete de silicone que fazia a proteção e evitava o entupimento da cânula guia. Após o procedimento, o animal permanecia sobre uma almofada aquecida até a completa recuperação do procedimento, retornando ao biotério. Lá permaneciam sem manipulação até o 3º ou 4º dia de lactação, dia no qual era realizada a habituação da fêmea.

3.1.4 Pré-tratamento com drogas

Para a realização do Experimento 2, fêmeas prenhes receberam tratamento anterior ao teste comportamental com 400 µg de progesterona diluída em óleo de amendoim ou apenas o óleo de amendoim, de maneira que foi aplicado por via subcutânea (s.c.) 0,2 ml de solução de óleo de amendoim contendo 400 µg de progesterona. As administrações foram feitas no período da manhã uma vez ao dia, do 17º ao 21º dia de gestação, preferencialmente por volta das 08h00.

3.1.5 Testes Comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados nos dias cinco ou seis de lactação para análises de comportamento materno, e nos dias seis ou sete de lactação para análises de comportamento similar à ansiedade. Os testes envolvendo

experiência reprodutiva foram realizados com ratas virgens de aproximadamente 90 dias e ratas no 18º dia de prenhez.

Os parâmetros do comportamento maternal e/ou predatório foram analisados com o auxílio do programa de análises comportamentais Etholog 2.2 (OTTONI, 2000). Para análise do Experimento 6, foi utilizado *software* específico desenvolvido pelo próprio laboratório do Prof. Dr. Joseph S. Lonstein da *Michigan State University*.

3.1.5.1 Teste de Comportamento Materno (Experimento 1)

Mães foram privadas de água, comida e de seus filhotes 30 minutos antes do início do teste comportamental. Após trinta minutos, foram colocados no aparato experimental ou na caixa moradia os 8 filhotes previamente separados.

As observações e filmagens comportamentais foram realizadas durante o período de 30 minutos consecutivos (1800s), tempo no qual a rata permaneceu no aparato experimental ou na caixa moradia, em uma sala isolada, sem a presença de outros animais ou do experimentador, apenas com seus filhotes e a câmera filmadora.

3.1.5.2 Teste de Comportamento Materno (Experimento 6)

Os filhotes eram removidos da incubadora e era feito, com o auxílio de um *swab*, um procedimento que simulava a mãe lambendo os filhotes na região anogenital. Tal procedimento é importante porque na fase de desenvolvimento em que se encontravam, estes filhotes não possuíam habilidade de urinar e defecar sem que houvesse o estímulo físico da lambida da mãe. Visto que houve 90 minutos de separação entre mãe e filhotes, e possivelmente estes filhotes estariam com uma quantidade considerável de urina e fezes sem excretar, isso poderia gerar uma vocalização ultrassônica por parte dos filhotes e alterar o comportamento inicial de cuidados maternos (LONSTEIN, 2005). Os filhotes foram então pesados novamente

e colocados na presença da mãe todos ao mesmo tempo, e no lado oposto ao da formação do ninho, sinalizado previamente pelo papel cartão. Vários parâmetros de comportamento materno e atividade geral da mãe foram analisados continuamente durante 45 minutos com a ajuda de um *notebook* e um *software* específico para análise de comportamento personalizado e utilizado apenas no laboratório do Dr. Lonstein. Após a finalização da análise comportamental, os filhotes eram pesados novamente para análise da ingestão de leite.

3.1.5.3 Teste de Seleção Comportamental e Predação

Para os testes de seleção comportamental as mães foram privadas de comida, água e de seus filhotes uma hora antes do início do teste comportamental. Após trinta minutos, as mães receberam ou não injeções periféricas (s.c.) ou centrais via cânula guia anteriormente implantada. O teste comportamental iniciou aos sessenta minutos após a separação dos filhotes e trinta minutos após a injeção da droga (desafio farmacológico), tempo no qual foram colocados no aparato experimental apenas com os 8 filhotes ou juntamente com 5 baratas (*Picnocellus surinamensis*) vivas e íntegras. Para o teste de predação o mesmo procedimento era repetido, com a diferença de que apenas os 5 insetos eram introduzidos na caixa experimental juntamente com o animal a ser testado.

As observações e filmagens comportamentais foram realizadas durante o período de 30 minutos consecutivos (1800s), tempo no qual a rata permaneceu no aparato experimental específico confeccionado em acrílico, em uma sala isolada, sem a presença de outros animais ou do experimentador, apenas com a câmera filmadora.

3.1.5.4 Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Aproximadamente 24 horas após a realização do teste de comportamento materno, o mesmo animal era submetido a um teste de análise de comportamento similar à ansiedade em labirinto em cruz elevado. O procedimento de injeção de drogas era repetido, conforme descrito anteriormente, com algumas modificações. O animal era trazido à sala de injeção da droga e separado dos seus filhotes apenas no momento da injeção. Após a injeção, a fêmea retornava à caixa moradia e ao Biotério, aguardava os 30 minutos para o início do teste comportamental na presença dos filhotes. Durante os 30 minutos de espera da ação da droga, placas sinalizadoras eram colocadas na porta do Biotério para que ninguém entrasse ou fizesse barulho na sala, pois havia experimento em andamento. Tal procedimento é necessário para evitar estresse desnecessário do animal durante o período de ação da droga. A droga utilizada para injeção deveria ser obrigatoriamente diferente da droga utilizada no dia anterior para o teste de comportamento materno. Após os 30 minutos, os animais retornavam à sala de comportamento dentro da gaiola moradia. As fêmeas eram removidas da caixa e levadas rapidamente ao labirinto em cruz elevado suspensas pela base da cauda e apoiadas no braço do experimentador. Todo o procedimento foi realizado com a sala iluminada apenas com uma luz de 20 Watts. O labirinto em cruz era elevado 50 cm do chão, confeccionado em acrílico opaco preto, com quatro braços emergentes de um quadrado central de 10 cm X 10 cm. Os braços mediam 50 cm X 10 cm, sendo dois braços abertos e os outros dois braços parcialmente fechados por paredes com 40 cm de altura. A iluminação era de aproximadamente 28 lux nos braços abertos e 2 lux nos braços fechados. Cada fêmea era removida da gaiola moradia suspensa pela base da cauda e colocada diretamente no quadrado do centro do aparato, tendo o cuidado de sempre colocar os animais na mesma posição, com o focinho do animal posicionado em direção ao braço aberto. A caixa moradia com os filhotes era então retornada à sala adjacente. Uma câmera de vídeo Panasonic® (Secaucus, NJ, EUA) sensível à baixa intensidade de luz capturava as imagens e transmitia diretamente ao sistema de gravação de vídeos da sala adjacente. O experimentador analisava os dados na medida em que estes eram gerados no teste em tempo real, utilizando o mesmo

sistema utilizado para análise de comportamento materno. Assim, foram analisados o tempo em que a fêmea permaneceu nos braços abertos, nos braços fechados e no centro do aparato, bem como o número de entradas em cada braço e parâmetros de atividade geral exploratória e de *self grooming*. Foi considerado como entrada em um dos braços o momento em que a fêmea colocava sua cabeça e ambas as patas da frente em um dos braços. O tempo em que o animal ficou no quadrado central foi considerado apenas como o animal não estando presente em braços abertos ou fechados. O teste tinha duração total de 10 minutos (600s). Após a realização do teste, o animal era cuidadosamente removido do aparato e colocado novamente na gaiola moradia na presença dos filhotes, sendo a gaiola moradia imediatamente retornada ao Biotério. O aparato experimental era então higienizado com Álcool 70% e completamente seco antes que pudesse ser realizado outro teste comportamental com animal diferente.

3.2 LOCALIZAÇÃO DA INJEÇÃO EM SNC

Após o registro dos comportamentos maternal e predatório, as ratas foram profundamente anestesiadas com tiopental sódico e, perfundidas por via trans-aórtica inicialmente com 150ml de uma solução salina 0,9% seguida de 500ml de uma solução fixadora de formaldeído a 4% diluído em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 9,0). Os encéfalos permaneceram na caixa craniana por 3 horas antes de serem removidos e transferidos para uma solução crioprotetora contendo sacarose 20% em tampão fosfato de potássio 0,02M, onde permaneceram por aproximadamente 12 horas. A seguir, cortes frontais seriados, com 30µm de espessura foram obtidos utilizando-se um micrótomo de congelamento (Leica®). Os cortes foram colhidos sequencialmente em quatro compartimentos de forma que a distância entre os cortes num mesmo compartimento seja de 120µm.

Para o Experimento 6 o procedimento de perfusão transcardíaca foi realizado em período de até uma semana após os testes comportamentais. As fêmeas foram anestesiadas com altas doses (200 mg/Kg, IP) de Pentobarbital Sódio, foi aberto um acesso no tórax para exposição do coração. Através de uma agulha

inserida na artéria aorta através do coração (ventrículo esquerdo), foi feita a passagem de solução salina tamponada a 0,9% na velocidade de 30 mL/min, e volume aproximado de 200 mL. Quando o retorno do átrio direito se tornou límpido, iniciou-se a perfusão com a solução fixadora de formaldeído tamponado 4%, utilizando a mesma velocidade e volumes utilizados para solução salina. O animal foi então decapitado com guilhotina e o encéfalo removido da caixa craniana com o auxílio de uma goiva não cortante. O encéfalo foi submergido em formaldeído tamponado 4% durante 24 horas e mantido à temperatura de 4°C. Após esse procedimento, denominado pós-fixação, o encéfalo foi submergido em uma solução de sacarose 20%, no qual permaneceu à temperatura de 4°C durante no mínimo 48 horas e no máximo 7 dias. Os encéfalos foram seccionados em micrótomo de congelamento na espessura de 40 µm, montados em lâminas gelatinizadas e posteriormente corados com *Neutral Red*. As lâminas foram analisadas em aumento de 100X e mapeados de acordo com *Brain Maps* (PAXINOS; WATSON, 1998). Apenas os animais que apresentavam injeções localizadas precisamente na região neuroanatômica estudada foram incluídos para a análise dos dados.

3.3 DROGAS UTILIZADAS

PROGESTERONA (SIGMA-ALDRICH®) 4-pregнено-3,20-diona

SULFATO DE MORFINA (LABORATÓRIO CRISTÁLIA®)

ÓLEO DE AMENDOIM

SOLUÇÃO NaCl 0,9%

MIFEPRISTONA (SIGMA-ALDRICH®) RU486

PROGLUMIDE (SIGMA-ALDRICH®) N-benzoyl-N', N'-dipropyl-RS-isoglutamina (SIGMA-ALDRICH®)

TWEEN 20 (Bio-RAD®)

CGRP Rat (Tocris®)

CGRP 8-37 (Tocris®)

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita utilizando-se os *softwares* GraphPad Prism 5.0, GraphPad InStat, SigmaStat e XLStat. As análises iniciaram com um teste de Normalidade, visto que a variabilidade individual para testes comportamentais costuma ser significativa. Para os Experimentos 1, 2 e 5, seguimos análise com uma Análise de Variância (ANOVA) de duas vias para observar efeitos de interação entre duas variáveis. Foi realizada a ANOVA de uma via com pós teste de Tukey para comparações entre os grupos que apresentaram dados paramétricos. Para dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós teste de Dunn. Foi atribuída latência máxima para os animais que não expressaram determinados comportamentos. Foi considerada a probabilidade estatisticamente significativa quando $p < 0,05$ para todas as análises.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4.1 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 1: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO MEDIANTE DIFERENTES DESAFIOS AMBIENTAIS

Ratas no 5º ou 6º dia de lactação foram divididas nos seguintes grupos experimentais: fêmeas testadas na caixa moradia com maravalha (MoMa) ou sem maravalha (MoSm), fêmeas testadas na caixa de acrílico com maravalha (AcMa) ou sem maravalha (AcSm), conforme descrito anteriormente nos métodos. O teste comportamental foi efetuado na presença de oito filhotes para observação detalhada da influência do ambiente de teste nos cuidados maternos.

4.1.1 Resultados

Ratas lactantes apresentaram maior número de contatos com seus filhotes nos grupos testados sem maravalha tanto na caixa moradia (Figura 1A: KW = 17,88; $p = 0.0005$; MoMa X MoSm, $p < 0,05$), quanto na caixa de acrílico (Figura 1A: KW = 17,88; $p = 0.0005$; AcMa X AcSm, $p < 0,05$), quando comparados aos grupos que foram testados sem maravalha em ambos os tipos de caixa. O grupo de fêmeas testadas na caixa moradia com maravalha apresentou menos contatos com seus filhotes quando comparado ao grupo de fêmeas testadas na caixa de acrílico sem maravalha (Figura 1A: KW = 17,88; $p = 0,0005$; MoMa X AcSm, $p < 0,01$).

Em relação ao parâmetro de número de buscas de filhotes, fêmeas testadas na caixa de acrílico com maravalha buscaram menos vezes seus filhotes quando comparadas ao grupo de fêmeas testadas na caixa de acrílico com a presença de maravalha (Figura 1B: KW = 14,49; $p = 0,0023$; AcMa X AcSm, $p < 0,01$), bem como quando comparadas ao grupo de fêmeas testadas na caixa moradia sem maravalha (Figura 1B: KW = 14,49; $p = 0,0023$; AcMa X MoSm, $p < 0,05$).

Para a construção de ninho torna-se necessária a presença de maravalha na caixa de experimentação, por isso comparamos os dois grupos de animais que receberam maravalha nas caixas moradia e de acrílico, e não foi observado nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 1C: $p = 0.266$; AcMa X MoMa).

Em relação ao tempo gasto pela rata amamentando menos de 5 filhotes durante o teste comportamental, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, independentemente se testadas na caixa moradia ou de acrílico, na presença ou ausência de maravalha (Figura 1D: KW = 5,264; $p = 0.153$). O mesmo ocorreu em relação ao tempo gasto pela fêmea amamentando 5 ou mais filhotes (Figura 2A: KW = 1,081; $p = 0.781$).

Houve interação entre a presença de maravalha e o tipo de caixa em que o animal foi testado em relação ao comportamento de cifose fisiológica (Figura 2B: $F = 3,82$; $p = 0,05$), sendo que o grupo de animais testados na caixa de acrílico com maravalha permaneceu mais tempo em cifose quando comparado ao grupo de animais testados na caixa de acrílico sem maravalha (Figura 2B: $F = 3,82$; $p = 0,05$; AcMa X AcSm e AcMa X MoMa, $p = 0,03$).

A interação entre tipo de caixa e presença de maravalha também ocorreu em relação ao parâmetro de CMT, no qual fêmeas lactantes testadas na caixa de acrílico com maravalha apresentaram menores latências para a apresentação do CMT quando comparadas ao grupo de fêmeas testadas na caixa de acrílico sem a presença de maravalha (Figura 2C: $F = 4,76$; $p = 0,036$; AcMa X AcSm, $p = 0,05$).

Outros parâmetros comportamentais analisados como latência para a busca do 1º filhote (Tabela 1: KW = 3,080; $p = 0,379$), do 5º filhote (Tabela 1: KW = 0,342; $p = 0,951$), do 8º filhote (Tabela 1: KW = 5,582; $p = 0,133$), tempo gasto pela fêmea lactante lambendo seus filhotes (Tabela 1: KW = 3,953; $p = 0,266$), agrupando seus filhotes (Tabela 1: KW = 0,812; $p = 0,846$), fazendo *self grooming* (Tabela 1: KW = 3,367; $p = 0,338$), número de linhas cruzadas (Tabela 1: KW = 5,346; $p = 0,148$) e tempo que a fêmea permaneceu inativa durante o teste comportamental (Tabela 1: KW = 4,902; $p = 0,179$), não apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise estatística da comparação entre os grupos experimentais.

Figura 1 – Parâmetros de comportamento materno e atividade geral analisados no Experimento 1

Em (A), número de contatos com os filhotes; (B) número de vezes que a rata busca os filhotes; (C) tempo gasto pela rata construindo ninho; (D) tempo gasto pela rata amamentando menos do que 5 filhotes. Os dados são apresentados como média $\pm$ E.P.M. Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Figura (C) foi utilizado o teste t student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Grupos Experimentais: AcMa, $n = 10$; AcSm, $n = 10$; MoMa, $n = 9$; MoSm, $n = 8$.

Figura 2 – Parâmetros de comportamento materno e atividade geral analisados no Experimento 1

Em (A), tempo gasto pela rata amamentando menos do que 5 filhotes; (B) tempo gasto pela rata em postura de cifose; (C) latência para efetuar o CMT; (D) tempo gasto pela rata explorando. Os dados são apresentados como média±E.P.M. Para (A) e (D), Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Figuras (B) e (C) foi utilizado ANOVA paramétrica de duas vias, sendo uma via o tipo de caixa para realização do teste e a outra via presença ou ausência de maravalha. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Grupos Experimentais: AcMa, $n = 10$; AcSm, $n = 10$; MoMa, $n = 9$; MoSm, $n = 8$.

Tabela 1 – Parâmetros comportamentais analisados no Experimento 1

Parâmetros	Grupos			
	MoMa	MoSm	AcMa	AcSm
Buscar 1 ^o filhote (s)	46,44±21,76	103,9±65,62	49,15±17,93	357,4±188,6
Buscar 5 ^o filhote (s)	299,9±190,2	583,5±266,2	506,1±224,1	549±179,9
Buscar 8 ^o filhote (s)	780±265,4	1512±196,5	853,3±224,2	1067±219,7
Lamber filhotes (s)	215,3±65,71	291,8±49,44	161,4±29,71	261,3±48,16
Agrupar filhotes (s)	36,85±12,96	59,22±22,09	53,44±12,01	81,57±34,87
<i>Self grooming</i> (s)	200±30,6	162,5±13,24	145,6±29,7	173,3±36,82
Linhas cruzadas	74,11±8,55	88,38±12,07	63,8±10,07	100,1±11,87
Inativo (s)	170,5±77,71	36,63±24,15	146,5±51,21	102,6±87,91

Os dados são apresentados em média ± erro padrão médio. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn para comparações grupo a grupo. Grupos experimentais (MoMa) Gaiola moradia com maravalha, $n = 9$; (MoSm) Gaiola moradia sem maravalha, $n = 8$; (AcMa) Caixa de acrílico com maravalha, $n = 10$; (AcSm) Caixa de acrílico sem maravalha, $n = 10$.

4.2 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 2: INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM PROGESTERONA AO FINAL DA GESTAÇÃO E SUA POSSÍVEL INTERAÇÃO COM O SISTEMA OPIOIDÉRGICO SOBRE A MODULAÇÃO COMPORTAMENTAL EM RATAS LACTANTES

Ratas prenhes foram divididas nos seguintes grupos experimentais: fêmeas pré-tratadas com 400 µg/dia progesterona (P) ou 0,2 mL de óleo de amendoim (O) s.c. ao final da gestação e desafiados com 1,5 mg/kg de sulfato de morfina (grupos PM e OM) ou solução salina (grupos PS e OS) no 5^o ou 6^o dia de lactação, no momento do teste comportamental, conforme descrito anteriormente nos métodos. O teste comportamental foi efetuado na presença de insetos do gênero *Picnocellus surinamensis* e filhotes para observação detalhada da influência farmacológica do hormônio progesterona, bem como sua possível interação com o opióide sulfato de morfina, sobre os cuidados maternos e o comportamento predatório.

4.2.1 Resultados

Em relação ao parâmetro de latência para a busca do 1º filhote, houve interação entre o pré-tratamento durante o terço final da gestação e o desafio farmacológico no 5º dia de lactação, sendo que o grupo OS apresentou menores latências para busca quando comparado aos grupos PS, OM e PM (Figura 3A: KW = 26,25; $p < 0,0001$; OS X PS, $p < 0,05$; OS X OM e OS X PM, $p < 0,0001$).

Fêmeas do grupo OS apresentaram menores latências para a busca do 5º filhote quando comparadas às fêmeas dos grupos OM e PM (Figura 3B: KW = 21,55; $p < 0,0001$; OS X OM e OS X PM, $p < 0,0001$).

De maneira similar, as fêmeas do grupo OS também apresentaram menores latências para a busca do 8º filhote quando comparadas às fêmeas do grupo PS, OM e PM, havendo o efeito de interação entre o pré-tratamento e o desafio farmacológico (Figura 3C: F = 6,901; $p = 0,0009$; OS X PS, $p < 0,05$; OS X OM, $p < 0,01$ e OS X PM, $p < 0,01$).

O grupo PM apresentou maior número de contatos com seus filhotes quando comparado ao grupo OS e OM (Figura 3D: KW = 16,39; $p = 0,0009$; OS X PM e OM X PM, $p < 0,01$).

Em relação ao número de buscas de filhotes, fêmeas do grupo PM buscaram menos vezes seus filhotes quando comparadas às fêmeas dos grupos PS e OS (Figura 4A: KW = 18,30; $p = 0,0004$; PM X PS, $p < 0,0001$; PM X OS, $p < 0,01$).

Não houve diferença estatisticamente significativa nas comparações entre os grupos experimentais no tempo gasto pelas fêmeas lactantes lambendo seus filhotes (Figura 4B: KW = 4,594; $p = 0,204$).

Fêmeas do grupo PM gastaram menos tempo em cifose do que as fêmeas do grupo OS, havendo interação entre o pré-tratamento durante o terço final de prenhez, e o desafio farmacológico na lactação (Figura 4C: F = 3,886; $p = 0,01$; PM X OS, $p < 0,05$).

Fêmeas do grupo PS passaram mais tempo amamentando seus filhotes, quando comparadas às fêmeas dos grupos OS, OM e PM, sendo que a interação entre o pré-tratamento e o desafio farmacológico também ocorreu na análise deste parâmetro de comportamento materno (Figura 4D: $F = 9,41$; $p = 0,0041$; PS X OS, $p < 0,01$; PS X OM e PS X PM, $p < 0,0001$).

Em relação aos parâmetros de predação, fêmeas do grupo OS apresentaram maiores latências para a captura do 1º inseto quando comparadas às fêmeas dos grupos OM e PM (Figura 5A: KW = 18,07; $p = 0,0004$; OS X PS e OS X PM, $p < 0,05$). Em contrapartida, fêmeas do grupo OM apresentaram menores latências para captura do 1º inseto quando comparadas às fêmeas dos grupos PS e PM (Figura 5A: KW = 18,07; $p = 0,0004$; OM X PS e OM X PM, $p < 0,01$). Para as latências de captura do 5º inseto, as comparações entre os grupos não geraram diferenças estatisticamente significantes (Figura 5B: $F = 1,076$; $p = 0,371$).

Em relação ao tempo gasto pelas fêmeas fazendo *self grooming*, não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos (Figura 5C: $F = 1,210$; $p = 0,320$), sendo que o mesmo fenômeno ocorreu quando foi analisado o tempo gasto pelas fêmeas explorando a caixa experimental (Figura 5D: $F = 0,771$; $p = 0,517$). Porém, animais do grupo OS ficaram menos tempo inativos durante o tempo total de teste experimental quando comparados aos animais dos grupos OM e PM, sendo que o mesmo ocorreu com as fêmeas do grupo PS quando comparadas às fêmeas do grupo PM (Figura 5E: KW = 16,49; $p = 0,0009$; OS X OM e OS X PM, $p < 0,01$; PS X PM, $p < 0,05$).

Figura 3 – Parâmetros de comportamento analisados no Experimento 2

Em (A), latência para a busca do 1º filhote; (B) latência para a busca do 5º filhote; (C) latência para a busca do 8º filhote; (D) número de contatos com filhotes. Os dados são apresentados como média±E.P.M. Para (A), (C) e (D), Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Figura (B) foi utilizado ANOVA paramétrica de duas vias, sendo uma via o pré-tratamento e a outra via o desafio farmacológico no dia do teste comportamental. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Grupos Experimentais: OS, $n = 10$; PS, $n = 10$; PS, $n = 10$; PM, $n = 10$.

Figura 4 – Parâmetros de comportamento analisados no Experimento 2

Em (A), número de vezes que a rata busca os filhotes; (B) tempo gasto pela rata lambendo seus filhotes; (C) tempo gasto pela rata na posição de cifose fisiológica; (D) tempo gasto pela rata amamentando seus filhotes. Os dados são apresentados como média±E.P.M. Para (A), e (B), Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Figuras (C) e (D) foi utilizado ANOVA paramétrica de duas vias, sendo uma via o pré-tratamento e a outra via o desafio farmacológico no dia do teste comportamental. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Grupos Experimentais: OS, $n = 10$; PS, $n = 10$; PS, $n = 10$; PM, $n = 10$.

Figura 5 – Parâmetros de comportamento analisados no Experimento 2

Em (A), latência para a captura do 1º inseto; (B) latência para a captura do 5º inseto; (C) tempo gasto pela fazendo *self grooming*; (D) tempo gasto pela explorando a caixa experimental; (E) tempo em que a rata permaneceu inativa. Os dados são apresentados como média±E.P.M. Para (A), e (E), Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Figuras (B), (C) e (D) foi utilizado ANOVA paramétrica de duas vias, sendo uma via o pré-tratamento e a outra via o desafio farmacológico no dia do teste comportamental. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Grupos Experimentais: OS, $n = 10$; PS, $n = 10$; PS, $n = 10$; PM, $n = 10$.

4.3 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 3: MODULAÇÃO COMPORTAMENTAL APÓS A INJEÇÃO CENTRAL DE PROGESTERONA E MIFEPRISTONA NA PAGrl EM RATAS LACTANTES

Ratas no 14^o ou 15^o dia de gestação foram submetidas à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula na PAGrl conforme descrito anteriormente nos métodos. No momento do teste comportamental as fêmeas receberam, via cânula guia e por meio de seringa de Hamilton® acoplada a uma bomba injetora de alta precisão (Harvard Apparatus Model®), dose única de 1,0 µg/0,6 µl de progesterona (PR), 1,0 µg/0,6 µl de mifepristona (RU) ou 0,6 µl de óleo de amendoim (VE). O teste comportamental foi realizado na presença de filhotes e insetos como anteriormente descrito. Após a realização do teste comportamental, os encéfalos foram coletados para processamento e visualização do local de injeção.

4.3.1 Resultados

Ao comparar os grupos em relação à latência para a busca do 1^o (Figura 6A: $F = 1,529$; $p = 0,233$), 5^o (Figura 6B: $F = 0,167$; $p = 0,846$) e 8^o filhotes (Figura 6C: $KW = 0,482$; $p = 0,785$), não houve diferença estatisticamente significativa. O mesmo ocorreu em relação ao comportamento de cifose sobre menos de 5 filhotes, conforme demonstra a figura 6D ($KW = 2,687$; $p = 0,260$).

As fêmeas lactantes que receberam injeção aguda de progesterona na PAGrl permaneceram menos tempo em cifose sobre 5 ou mais filhotes quando comparadas ao grupo controle VE (Figura 6E: $KW = 3,788$; $p = 0,150$). As mesmas fêmeas do grupo PR apresentaram maiores latências para a expressão do CMT quando comparadas ao grupo VE, conforme mostra a figura 6F ($KW = 9,055$; $p = 0,01$).

Outros parâmetros comportamentais analisados, tais como, número de contato com filhotes (Tabela 2: $F = 0,123$; $p = 0,884$), número de vezes que a fêmea lactante busca seus filhotes (Tabela 2: $F = 0,389$; $p = 0,680$), tempo gasto pela rata mãe lambendo seus filhotes (Tabela 2: $KW = 4,202$; $p = 0,122$), tempo gasto pela fêmea agrupando seus filhotes (Tabela 2: $F = 0,112$; $p = 0,893$), tempo gasto pela rata em *self grooming* (Tabela 2: $F = 1,776$; $p = 0,187$), tempo gasto em exploração da caixa experimental (Tabela 2: $F = 1,445$; $p = 0,252$), número de linhas cruzadas durante o tempo total do teste comportamental (Tabela 2: $F = 0,078$; $p = 0,924$), tempo em que a fêmea permaneceu inativa sem expressar nenhum tipo de comportamento (Tabela 2: $KW = 1,104$; $p = 0,575$), número de contatos com os insetos (Tabela 2: $F = 0,529$; $p = 0,594$), latência para a captura do 1º inseto (Tabela 2: $F = 1,047$; $p = 0,363$) e latência para a captura do 5º inseto (Tabela 2: $F = 0,749$; $p = 0,481$) não apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise estatística da comparação dos grupos experimentais.

Figura 6 – Parâmetros de comportamento analisados no Experimento 3

Em (A), latência para a busca do 1º filhote; (B) latência para a busca do 5º filhote; (C) latência para a busca do 8º filhote; (D) tempo gasto pela fêmea em cifose sobre menos de 5 filhotes; (E) tempo gasto pela fêmea em cifose sobre 5 ou mais filhotes; (F) latências para a expressão de CMT. Os dados são apresentados como média±E.P.M. Para (C), (D), (E) e (F), Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Figuras (A) e (B) foi utilizado ANOVA paramétrica de duas vias, sendo uma via o pré-tratamento e a outra via o desafio farmacológico no dia do teste comportamental. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Grupos Experimentais: VE, $n = 8$; RU, $n = 11$; PR, $n = 13$.

Tabela 2 – Parâmetros comportamentais analisados no Experimento 3

Parâmetros	Grupos		
	VE	RU	PR
Contato com filhotes	7,62±2,4	7,72±1,75	8,76±1,61
Busca de filhotes (s)	4,63±0,79	3,31±0,97	3,43±1,17
Lamber filhotes (s)	127,7±24,39	96,88±38,98	91,31±17,89
Agrupar filhotes (s)	37,72±10,17	38,86±19,59	46,30±19,49
<i>Self grooming</i> (s)	170,7±25,13	121,1±28,49	187,6±25,26
Explorar (s)	569,4±59,6	560±61,28	666,9±36,98
Linhas cruzadas	60,5±4,03	59,82±7,5	62,77±4,64
Inativo (s)	46,61±14,84	187±109,7	78,53±20,89
Contato com insetos (s)	6,12±1,84	4,90±1,24	6,92±1,39
Capturar do 1º inseto (s)	910,3±281,8	1104±223,3	701,8±149,1
Capturar do 5º inseto (s)	1560±163,5	1610±84,49	1425±111,5

Os dados são apresentados em média ± erro padrão médio. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn para comparações grupo a grupo. Grupos experimentais (VE) Veículo, $n = 8$; (RU) Mifepristona, $n = 11$; (PR) Progesterona, $n = 13$.

4.4 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 4: EFEITOS DO PROGLUMIDE NA MODULAÇÃO COMPORTAMENTAL EM RATAS LACTANTES

Ratas lactantes foram divididas nos seguintes grupos experimentais: fêmeas que receberam desafio farmacológico de 20 mg/kg com solução de proglumide (PRGL) ou veículo (VE) trinta minutos após o processo de habituação, e foram

testadas trinta minutos após o desafio, conforme descrito anteriormente nos métodos. O teste comportamental foi efetuado na presença de oito filhotes e cinco insetos do gênero *Picnocellus surinamensis* para observação detalhada da influência do desafio farmacológico na seleção comportamental.

4.4.1 Resultados

Fêmeas lactantes desafiadas com proglumide buscaram mais vezes seus filhotes quando comparadas ao grupo controle (Tabela 3: *t student*, $p = 0,05$), bem como passaram mais tempo amamentando seus filhotes (Tabela 3: *t student*, $p = 0,007$).

Ratas do grupo controle permaneceram mais tempo na posição de cifose fisiológica sobre 5 ou mais filhotes (Tabela 3: *t student*, $p = 0,009$), gastaram mais tempo fazendo *self grooming* (Tabela 3: *t student*, $p = 0,05$) e apresentaram menores latências para a captura do 5º inseto (Tabela 3: *t student*, $p = 0,04$).

Em relação ao número de vezes que as ratas entraram em contato com seus filhotes (Tabela 3: *t student*, $p = 0,364$), tempo gasto pelas ratas lambendo seus filhotes (Tabela 3: *t student*, $p = 0,386$), tempo em posição de cifose sobre menos de 5 filhotes (Tabela 3: *t student*, $p = 0,238$), latência para expressar o CMT (Tabela 3: *t student*, $p = 0,114$), número de contatos com insetos (Tabela 3: *t student*, $p = 0,475$), latência para a captura do 1º inseto (Tabela 3: *t student*, $p = 0,459$), tempo gasto pela fêmea comendo insetos (Tabela 3: *t student*, $p = 0,102$), número de linhas cruzadas durante o tempo total de teste comportamental (Tabela 3: *t student*, $p = 0,172$), tempo gasto pela rata em exploração da caixa experimental (Tabela 3: *t student*, $p = 0,303$) e em relação ao tempo no qual a rata permaneceu inativa sem expressar nenhum tipo de comportamento (Tabela 3: *t student*, $p = 0,302$), não houveram diferenças estatisticamente significante nas comparações entre os grupos experimentais.

Tabela 3 – Parâmetros comportamentais analisados no Experimento 4

Parâmetros	Grupos	
	VE	PROGL
Contato com filhotes	6,2±0,51	5,51±1,71
Busca de filhotes	9,21±2,72	16,58±3,18*
Lamber filhotes (s)	88,42±13,42	81,45±18,56
Amamentar (s)	37,61±12,33	101,9±19,68**
Cifose < 5 filhotes (s)	816±271,7	566,5±218,2
Cifose > 5 filhotes (s)	1679±130,8	1021±206,9**
Comportamento materno total (s)	1773±37,31	1684±57,44
<i>Self grooming</i> (s)	161,4±34,58	106,8±14,99*
Contato com insetos	22,8±3,78	22,33±5,94
Capturar do 1º inseto (s)	1030±189	1060±216,9
Capturar do 5º inseto (s)	1795±14,67	1375±209,3*
Comer insetos (s)	384±91,77	224,7±80,2
Linhas cruzadas	110,3±9,06	93,92±13,48
Explorar (s)	902,5±46,09	856,9±69,46
Inativo (s)	72,78±19,28	53,42±29,47

Os dados são apresentados em média ± erro padrão médio. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn para comparações grupo a grupo. * indica $p < 0,05$ e ** indica $p < 0,01$ em relação ao grupo controle VE.

Grupos experimentais (VE) Veículo, $n = 10$; (PROGL) Proglumide, $n = 12$.

4.5 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 5: EFEITOS DO PROGLUMIDE NO COMPORTAMENTO PREDATÓRIO DE RATAS FÊMEAS EM DIFERENTES FASES REPRODUTIVAS

Ratas foram divididas em grupos de acordo com seu estado fisiológico reprodutivo: ratas virgens que receberam 20 mg/kg de solução de proglumide (VP) ou veículo (VV); ratas em 18º ou 19º dia de prenhez que receberam solução de

proglumide (PP) ou veículo (PV) e ratas em 5º ou 6º dia de lactação que receberam solução de proglumide (LP) ou veículo (LV) em dose única por via s.c., trinta minutos após a habituação. Trinta minutos após a injeção o teste comportamental foi efetuado na presença de cinco insetos do gênero *Picnocellus surinamensis* para observação detalhada da influência do desafio farmacológico na caça predatória de ratas em diferentes estados reprodutivos.

4.5.1 Resultados

No Experimento 5, para análise inicial dos parâmetros de comportamento predatório, utilizamos ANOVA de duas vias paramétrica, na qual em uma via foi estabelecido o efeito do estado reprodutivo em que a fêmeas se encontrava e na outra via foi estabelecido o efeito do desafio farmacológico no dia do teste comportamental, para o estudo da interação destas duas variáveis. Houve efeito da experiência reprodutiva influenciando os comportamentos, porém sem interação com o efeito farmacológico. O efeito da administração das drogas *per se* não influenciou na expressão ou inibição dos parâmetros comportamentais analisados.

Em relação aos parâmetros de comportamento exploratório (Figura 7A: KW = 2,084; $p = 0,837$), número de linhas cruzadas pelo animal durante o teste comportamental (Figura 7B: $F = 0,983$; $p = 0,714$), número de contatos com insetos (Figura 7C: $F = 0,496$; $p = 0,778$), tempo gasto pela fêmea comendo insetos (Figura 7D: $F = 1,786$; $p = 0,129$), tempo gasto pela fêmea fazendo *self grooming* (Figura 7E: $F = 2,179$; $p = 0,068$), tempo em que a fêmea permaneceu inativa (Figura 7F: $F = 0,708$; $p = 0,619$), não houveram diferenças estatisticamente significante nas comparações entre os grupos experimentais. O mesmo ocorreu em relação à comparação das latências para captura do 1º (Figura 8A: $F = 2,155$; $p = 0,071$) e 5º insetos (Figura 7E: $F = 1,710$; $p = 0,146$).

Fêmeas do grupo VS apresentaram maiores latências para a captura do 2º inseto quando comparadas às fêmeas do grupo LS (Figura 8B: $F = 2,356$; $p = 0,05$; VS X LS, $p < 0,05$), bem como apresentaram maiores latências para a captura do 3º (Figura 8C: $KW = 11,23$; $p = 0,047$; VS X PP, $p < 0,05$) e 4º insetos (Figura 8D: $F = 2,436$; $p = 0,044$; VS X PP, $p < 0,05$) quando comparadas às ratas do grupo PP.

Figura 7 – Parâmetros de comportamento analisados no Experimento 5

Em (A), tempo gasto pela fêmea explorando a caixa experimental; (B) número de linhas cruzadas; (C) número de contatos com insetos; (D) tempo gasto pela fêmea comendo insetos; (E) tempo gasto pela fêmea fazendo *self grooming*; (F) tempo em que a fêmea permaneceu inativa. Os dados são apresentados como média ± E.P.M. Para (A), e (B), Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Figuras (C), (D), (E) e (F) foi utilizado ANOVA paramétrica de duas vias, sendo uma via o estado reprodutivo e a outra via o desafio farmacológico no dia do teste comportamental. Grupos Experimentais: VS, $n = 10$; PS, $n = 10$; LS, $n = 10$; VP, $n = 12$; PP, $n = 12$; LP, $n = 12$.

Figura 8 – Parâmetros de comportamento analisados no Experimento 5

Em (A), latência para captura do 1º inseto; (B) latência para captura do 2º inseto; (C) latência para captura do 3º inseto; (D) latência para captura do 4º inseto; (E) latência para captura do 5º inseto; (F) tempo em que a fêmea permaneceu inativa. Os dados são apresentados como média $\pm$ E.P.M. Para (C), Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Figuras (A), (B), (D) e (E) foi utilizado ANOVA paramétrica de duas vias, sendo uma via o estado reprodutivo e a outra via o desafio farmacológico no dia do teste comportamental.

Grupos Experimentais: VS, $n = 10$; PS, $n = 10$; LS, $n = 10$; VP, $n = 12$; PP, $n = 12$; LP, $n = 12$.

4.6 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DO PEPTÍDEO RELACIONADO AO GENE DA CALCITONINA (CGRP) EM ESTRUTURAS RELACIONADAS À ANSIEDADE EM RATAS LACTANTES

Entre os dias 15 e 17 de gestação, as ratas foram submetidas à cirurgia estereotáxica para a implantação da cânula guia bilateral. Um dia antes da realização do teste comportamental, os animais foram manuseados e habituados ao procedimento de injeção de drogas. O teste de análise de comportamento materno foi realizado no 6º ou 7º dia de lactação. As ratas lactantes foram divididas nos seguintes grupos experimentais: ratas que receberam 200 µg/0,125 µL por lado do vBST do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), ratas que receberam 200 µg/0,125 µL por lado do vBST do antagonista farmacológico do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (α -CGRP) e ratas que receberam 0,125 µL por lado do vBST de veículo (VE). As ratas receberam as drogas em dose única uma hora após a habituação, via agulha injetora com o auxílio de seringa Hamilton®, e foram testadas com seus oito filhotes trinta minutos após a administração das drogas.

Aproximadamente 24 horas após a realização do teste de comportamento materno, o mesmo animal era submetido a um teste de análise de comportamento similar à ansiedade em labirinto em cruz elevado. O procedimento de injeção de drogas era repetido, conforme descrito anteriormente, porém sem o período de habituação e sem privação dos filhotes. A droga injetada para o teste de LCE era obrigatoriamente diferente da droga utilizada para o teste no dia anterior. A rata permanecia sem os filhotes apenas durante a administração das drogas, retornando em seguida à caixa moradia. Após os 30 minutos da injeção das drogas, as fêmeas eram removidas da caixa e levadas rapidamente ao labirinto em cruz elevado suspensas pela base da cauda e apoiadas no braço do experimentador. Durante 10 minutos consecutivos eram analisados parâmetros de atividade geral exploratória e de *self grooming*. Após a realização do teste comportamental, os encéfalos foram coletados para processamento e visualização do local de injeção.

4.6.1 Resultados

Ao analisarmos os dados de comportamento materno, fêmeas do grupo α -CGRP gastaram menos tempo em cifo do que as fêmeas do grupo controle VE (Tabela 4: KW = 6,268; $p = 0,04$; α -CGRP X VE, $p < 0,04$). Em relação aos parâmetros de busca do 1º filhote (Tabela 4: KW = 1,980; $p = 0,371$), busca do 5º filhote (Tabela 4: KW = 2,157; $p = 0,340$) e busca do 8º filhote (Tabela 4: KW = 1,528; $p = 0,465$), tempo gasto pela rata amamentando seus filhotes (Tabela 4: KW = 3,824; $p = 0,147$), tempo gasto pela rata em construção de ninho (Tabela 4: KW = 1,763; $p = 0,414$), explorando a caixa moradia (Tabela 4: KW = 0,673; $p = 0,714$), tempo em que a rata permaneceu inativa no ninho junto aos seus filhotes (Tabela 4: KW = 0,456; $p = 0,795$), inativa sem expressar nenhum tipo de comportamento (Tabela 4: KW = 1,361; $p = 0,506$), lambendo seus filhotes (Tabela 4: KW = 1,294; $p = 0,523$), número de vezes que buscou seus filhotes (Tabela 4: KW = 0,949; $p = 0,622$) e tempo gasto pela fêmea fazendo *self grooming* (Tabela 4: KW = 1,344; $p = 0,510$), não houveram diferenças estatisticamente significante nas comparações entre os grupos experimentais.

Nas comparações entre os grupos nos parâmetros comportamentais analisados no teste de LCE, não houve diferença estatisticamente significante nos parâmetros de número de vezes que a fêmea entrou nos braços fechados (Tabela 5: KW = 2,387; $p = 0,303$), número de vezes que a rata entrou nos braços abertos (Tabela 5: KW = 0,893; $p = 0,639$), tempo em que a fêmea permaneceu nos braços fechados (Tabela 5: KW = 1,762; $p = 0,414$) e tempo em que a fêmea permaneceu nos braços abertos (Tabela 5: KW = 2,335; $p = 0,311$).

Tabela 4 – Parâmetros de comportamento materno e atividade geral analisados no Experimento 6

Parâmetros	Grupos		
	VE	α -CGRP	CGRP
Buscar 1 ^o filhote (s)	9,77 $\pm$ 3,73	552,8 $\pm$ 539,4	415,1 $\pm$ 267,4
Buscar 5 ^o filhote (s)	372,1 $\pm$ 294,4	575,8 $\pm$ 533,6	1014 $\pm$ 396,5
Buscar 8 ^o filhote (s)	1521 $\pm$ 469,9	1125 $\pm$ 647,1	1986 $\pm$ 374,1
Amamentar (s)	91 $\pm$ 33,06	189 $\pm$ 74,93	41,03 $\pm$ 15,55
Cifose (s)	1432 $\pm$ 205,5	679,4 $\pm$ 269,8*	896,6 $\pm$ 219
Construir ninho (s)	26,02 $\pm$ 9,13	55,42 $\pm$ 21,8	25,13 $\pm$ 14,8
Explorar (s)	396,2 $\pm$ 188,9	362,6 $\pm$ 162,50	349,5 $\pm$ 66,96
Inativo no ninho (s)	152 $\pm$ 75,77	263,4 $\pm$ 107,6	184,6 $\pm$ 81,46
Inativo (s)	5,78 $\pm$ 2,82	31,18 $\pm$ 15,77	262,4 $\pm$ 222,8
Lamber filhotes (s)	299,8 $\pm$ 47,54	249,8 $\pm$ 89,17	212,9 $\pm$ 38,21
Busca de filhotes	6,11 $\pm$ 0,77	6,22 $\pm$ 1,54	5,3 $\pm$ 0,91
<i>Self grooming</i>	136,3 $\pm$ 33,48	214,8 $\pm$ 54,65	192 $\pm$ 43,58

Os dados são apresentados em média $\pm$ erro padrão médio. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn para comparações grupo a grupo. * indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle VE.

Grupos experimentais (VE) Veículo, $n = 9$; (α -CGRP) Antagonista do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, $n = 5$; (CGRP) Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, $n = 10$.

Tabela 5 – Parâmetros de comportamento similar à ansiedade analisados no Experimento 6

Parâmetros	Grupos		
	VE	α -CGRP	CGRP
Braços fechados (frequência)	14 $\pm$ 1,09	12,2 $\pm$ 0,86	11,75 $\pm$ 2,25
Braços abertos (frequência)	8,16 $\pm$ 1,7	7 $\pm$ 1,39	6,5 $\pm$ 1,32
Braços fechados (s)	449,2 $\pm$ 35,29	477,60 $\pm$ 20,21	496,3 $\pm$ 15,73
Braços abertos (s)	8,16 $\pm$ 1,7	7 $\pm$ 1,39	6,5 $\pm$ 1,32

Os dados são apresentados em média $\pm$ erro padrão médio. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn para comparações grupo a grupo. Grupos experimentais (VE) Veículo, $n = 6$; (α -CGRP) Antagonista do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, $n = 10$; (CGRP) Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, $n = 4$.

5 DISCUSSÃO

Por meio de manipulações farmacológicas e de enriquecimento ambiental é possível que se consiga melhorar o entendimento da neurobiologia do comportamento materno, e este foi o principal objetivo deste trabalho.

Enriquecimento ambiental para ratos de laboratório pode ser definido como qualquer melhoria ou complexidade induzida nas condições da caixa moradia, além dos tradicionais adereços, tais como água, alimento e forragem. Na maioria dos estudos, o enriquecimento é promovido com a introdução de objetos inanimados, e denominado enriquecimento físico e/ou a presença de seres vivos coespecíficos ou heteroespecíficos, denominado enriquecimento social (BAUMANS, 2005). O enriquecimento ambiental tem sido amplamente utilizado para avaliar mudanças morfológicas, fisiológicas e de comportamento em função da modificação ambiental (MOHAMMED et al., 2002; FOX; MERALI; HARRISON, 2006). O Experimento 1 foi planejado para esclarecer a influência da manipulação do ambiente básico de testes de comportamento materno. Sabe-se que o enriquecimento ambiental pode reduzir a ansiedade (BENAROYA-MILSHTEIN et al., 2004; BRENES SÁENZ; VILLAGRA; FORNAGUERA TRÍAS, 2006; CHAPILLON et al., 1999) e que os efeitos comportamentais promovidos podem se estender por até 3 meses após a remoção do enriquecimento ambiental (FRISKE; GAMMIE, 2005). Observou-se uma grande influência da presença de maravalha na expressão do comportamento materno, porém não houve diferenças comportamentais devido ao uso da caixa de acrílico utilizada preferencialmente em testes de predação. O motivo para a não utilização da maravalha nos testes de comportamento predatório é de que os insetos se escondem facilmente, sendo que um dos maiores estímulos para o início da caça é justamente a visualização do inseto se movimentado. Anteriormente já havíamos utilizado outras espécies de insetos, e foi observado que insetos que não se movimentavam na caixa não despertavam a atenção das ratas. E ao colocar a maravalha na caixa, mesmo que em quantidades menores do que as habitualmente utilizadas, os insetos facilmente se escondiam.

A caixa de acrílico foi especialmente pensada e projetada em função de uma melhor visualização dos insetos e dos filhotes, sendo de fácil higienização e totalmente vedada, apesar de permitir a ventilação adequada. As filmagens e observações dos animais no paradigma de modulação comportamental ocorriam facilmente nessa caixa de acrílico.

A presença de maravalha alterou principalmente o que a literatura relata como cuidados maternos diretos, tais como busca, amamentação, cifo e CMT. Em relação aos parâmetros de contato e busca de filhotes, houve uma diminuição estatisticamente significativa em ambos os parâmetros nos grupos de animais testados com maravalha. Isto de certa forma parece um tanto quanto paradoxal, pois hipoteticamente a maravalha serviria como enriquecimento ambiental para a construção de ninho, e conseqüentemente melhor expressão de comportamento materno. Porém, o que observamos nos testes comportamentais é que, na presença de maravalha a rata mãe muitas vezes não pega seus filhotes com a boca e leva ao ninho, e sim acaba os empurrando com o focinho e as patas juntamente com a maravalha para a construção de um ninho ideal.

O parâmetro de construção de ninho pode ser avaliado apenas nos animais testados na presença de maravalha, e foi um excelente dado de indicação de que a influência não ocorre por parte do tipo de caixa em que o animal sofre o procedimento de experimentação, pois não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Animais testados pela nossa equipe nas caixas de acrílico, sempre passavam por um procedimento de habituação prévia ao teste, para que o animal se ambientasse com as diferenças entre a caixa moradia e a caixa experimental e que isso não fosse um fator extra para estímulo, por exemplo, da atividade exploratória dos animais. Porém, mesmo na tentativa de eliminar o fator “novidade”, observamos que animais na presença de maravalha, independente do tipo de caixa experimental, acabam por apresentar mais atividade exploratória. Isso pode ser facilmente explicado analisando os dados de expressão de comportamento materno, animais que foram testados nas caixas com maravalha, apresentam uma facilitação da expressão de comportamentos ligados aos cuidados dos filhotes, e conseqüentemente, gastam menos tempo em exploração.

Os opióides modulam a expressão do comportamento maternal, e a morfina é uma droga utilizada em estudos para um melhor entendimento das bases

neurobiológicas deste comportamento, por meio de manipulações farmacológicas e centrais (MIRANDA-PAIVA et al., 2003; CRUZ, 2009; CRUZ et al., 2010). Baixas doses de morfina mimetizam a ação dos opióides endógenos pela ação em receptores opioidérgicos no SNC. A progesterona pode agir como um fármaco em interação com a morfina na modulação de comportamentos durante a lactação, promovendo um fenômeno similar ao de tolerância reversa. Esta é a hipótese que sustentamos com o experimento relatado aqui. O Experimento 2 foi pensado em função de elucidar uma possível consequência comportamental da interação entre os sistemas opioidérgico e neuroendócrino, visto que foi observado anteriormente pela nossa equipe que o pré-tratamento com morfina no terço final do período gestacional da rata promove aumento nos níveis séricos de progesterona (SUKIKARA et al., 2011).

Podemos considerar que os insetos seriam uma espécie de enriquecimento ambiental, com impacto negativo sobre a expressão imediata do comportamento maternal, pois uma vez que as fêmeas visualizam os insetos, preferem muitas vezes atacar a presa do que buscar, agrupar e permanecer no ninho com seus filhotes. O enriquecimento ambiental, em determinadas situações, pode ter um impacto negativo sobre a expressão do comportamento maternal (MANN; GERVAIS, 2011).

Durante a execução do Experimento 2, conseguimos observar a influência do tratamento com progesterona e morfina. Cada uma dessas substâncias age de maneira negativa sobre os cuidados maternos. Ratas pré-tratadas com progesterona ao final da gestação e desafiadas com morfina no quinto dia de lactação (PM), apresentaram uma diminuição geral de interação e cuidados essenciais com seus filhotes.

Neste estudo consideramos mais o aspecto motivacional do que o motor porque nas doses utilizadas, não houve aumento de exploração da caixa experimental (forrageamento) do grupo PM em relação aos demais. Em contrapartida, houve um aumento do número de contatos com os filhotes no grupo PM quando comparado aos demais grupos. Este aumento no número de contatos foi considerado quantitativo e não qualitativo, ou seja, um maior número de contatos neste contexto não significa mais tempo dedicado aos cuidados com os filhotes, mas sim contatos “acidentais” com os filhotes nos momentos em que a mãe estava explorando a caixa experimental.

Ratas no período pós-parto costumam aumentar o tempo gasto com *self grooming*, principalmente na região das glândulas mamárias, o que promove maior ejeção de leite para a amamentação dos filhotes (ROTH; ROSENBLATT, 1968; SERAFIM; FELICIO, 2002). Observamos neste experimento que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, no tempo gasto pela mãe com *self grooming*.

A morfina pode promover um estímulo excitatório dependendo da dose utilizada e do contexto experimental. Neste paradigma, a dose desafio de 1,5 mg/Kg de morfina promoveu uma resposta inversa ao que é amplamente divulgado na literatura, pois animais dos grupos OM e PM, ou seja, que foram desafiados agudamente com morfina, permaneceram mais tempo inativos na caixa experimental.

Ratas mães pré-tratadas com óleo de amendoim e desafiadas com salina (OS) permaneceram mais tempo na posição de cifose fisiológica quando comparadas ao grupo controle PM. O pré-tratamento com progesterona e o desafio posterior com morfina parece influenciar o posicionamento de cifose da mãe, de maneira a prejudicá-lo, quando há a presença de filhotes e insetos na caixa experimental.

Muitas vezes, provavelmente devido à ausência de maravalha na caixa experimental, as mães “constroem” seus ninhos mais de uma vez em locais diferentes, buscando assim seus filhotes várias vezes. O grupo PS buscou menos vezes seus filhotes quando comparado ao grupo PM, e o grupo PM buscou menos os filhotes quando comparado ao grupo controle OS.

A fêmea lactante deve administrar seu tempo de maneira mais eficiente do que uma fêmea virgem ou um macho, pois o que está em jogo é a sobrevivência da ninhada, bem como sua própria sobrevivência. A gestação e a maternidade em ratas têm sido relacionadas a uma melhora no comportamento predatório (FERGUSON et al., 2008). Observando as latências para captura de insetos, houve diferença estatisticamente significativa apenas na captura do primeiro inseto, o qual está fortemente envolvido com aspectos motivacionais que levam as ratas à manifestação do comportamento predatório. Mães do grupo PS apresentaram latências maiores para a captura do primeiro inseto, ou seja, demoraram mais para capturar o primeiro inseto, quando comparadas aos grupos OS e OM, ao passo que

ratas lactantes do grupo PM apresentaram menores latências para a captura do primeiro inseto quando comparadas às ratas dos grupos OS e OM.

A estimulação opioidérgica diária leva a um aumento dos níveis séricos de progesterona (SUKIKARA et al., 2011). Tal aumento pode ser fator determinante para os ajustes motivacionais determinantes para a seleção de comportamentos durante a lactação. Assim, poderia ocorrer uma maior tendência ao abandono dos filhotes em consequência da motivação maior da rata mãe para caçar insetos. A progesterona por si só pode influenciar na densidade de receptores opióides, e sua ação inibitória sobre o comportamento maternal pode se dar por meio do estímulo à síntese de novos receptores (ŠLAMBEROVÁ et al., 2002, 2005). Como os modelos aqui estudados resultaram em consequências comportamentais, a principal hipótese levantada é a de que os ajustes comportamentais decorrentes do estímulo neuroendócrino no pré-parto, seriam consequências de alterações nos receptores do sistema opioidérgico possivelmente moduladas pela progesterona.

Em um estudo recente de nossa equipe foi demonstrado que os níveis séricos de progesterona encontram-se elevados em resposta à estimulação opioidérgica durante o final do período gestacional em ratas (SUKIKARA et al., 2011). Devido ao pré-tratamento com morfina induzir a um aumento dos níveis séricos de progesterona e também alterações comportamentais, a seguir, foi testada a possibilidade desse hormônio estar diretamente envolvido em mudanças comportamentais mediadas por opióides durante o início da lactação. A progesterona possui ações inibitórias sobre o comportamento maternal, e a diminuição nos níveis séricos de progesterona nos momentos que precedem o parto é um importante fator que determina o início dos cuidados maternos em relação a sua prole (MANN, 2006; BRUNTON; RUSSELL, 2010).

Mães pré-tratadas com progesterona apresentaram diferenças comportamentais em relação ao grupo controle, apenas ao serem desafiadas com morfina, que podem ser atribuídas a um aumento da sensibilidade aos opióides induzida pelo aumento nos níveis de progesterona sérica, aumentando a inibição do comportamento maternal nestas fêmeas.

Outra hipótese seria de que os insetos poderiam agir como um estímulo ansiogênico para as ratas mães lactantes, e devido a este aumento nos níveis de ansiedade, as ratas prefeririam forragear e caçar ao invés de expressar cuidados

maternais. Experimentos envolvendo teste de medidas de comportamentos similares à ansiedade, como o labirinto em cruz elevado, seriam necessários para tentar elucidar tais hipóteses.

Mudanças nos níveis séricos de progesterona durante o final do período gestacional podem modular os mecanismos que influenciam a seleção comportamental durante a lactação. O desafio com morfina estimulou a caça em animais previamente tratados com progesterona. Tal resposta é consistente com estudos anteriores do grupo (SUKIKARA et al., 2007; CRUZ et al., 2010).

Os resultados anteriores demonstram que o tratamento pré-natal com progesterona alterou o comportamento no pós-parto. O presente estudo sugere que o pré-tratamento com progesterona durante o período gestacional pode modificar a sensibilidade aos opióides e seus efeitos sobre o comportamento maternal e a seleção comportamental durante a lactação.

Os resultados obtidos no Experimento 3 indicam que a injeção central de progesterona diretamente na PAGrl promove alterações sutis nos parâmetros de comportamento materno e comportamento predatório durante o período inicial de lactação. Isso sugere que esse hormônio não tenha uma ação direta aguda em receptores da PAGrl. Para testar esta hipótese de outra forma foi testado, no mesmo paradigma comportamental, o antagonista competitivo a progesterona. A injeção central de mifepristona, antagonista da progesterona, na PAGrl não foi capaz de promover alterações nos parâmetros de comportamento maternal e predatório durante o período inicial de lactação. Assim, o resultado consistente sugere a ausência de ação direta tanto da progesterona exógena quanto endógena na PAGrl no que se refere ao controle desse paradigma de seleção comportamental durante a lactação. Tendo em vista o conjunto de dados anteriores que demonstrara a influência opioidérgica tanto nos comportamentos como nos níveis desse hormônio, fica em aberto a possibilidade da progesterona, agindo por períodos mais longos, influenciar a sensibilidade opioidérgica nesse sítio neural. Ratas desafiadas agudamente com progesterona na PAGrl permaneceram menos tempo em cifose fisiológica e apresentaram maiores latências para a expressão do comportamento materno quando comparadas ao grupo controle VE, porém não houve influência dos desafios farmacológicos na expressão do comportamento predatório neste paradigma.

Utilizando o mesmo paradigma de modulação comportamental, optamos por fazer um teste de bloqueio inespecífico de receptores de CCK no Experimento 4. Visto que a CCK promove uma facilitação de comportamento materno e aumenta a saciedade em diversos paradigmas de testes com animais, uma redução na expressão do comportamento materno acompanhada de uma facilitação na expressão do comportamento predatório com o bloqueio inespecífico agudo dos receptores de CCK utilizando-se o fármaco proglumide não seria surpreendente. Ao contrário do esperado, fêmeas desafiadas agudamente com proglumide passaram mais tempo amamentando em postura de cifose fisiológica sobre seus filhotes, bem como buscaram seus filhotes mais vezes e gastaram mais tempo em *self grooming*, quando comparadas às fêmeas do grupo controle VE. Porém apresentaram menores latências para a captura do quinto inseto quando comparadas ao grupo controle, sugerindo que o bloqueio inespecífico dos receptores de CCK neste paradigma de modulação comportamental foi eficiente apenas no que diz respeito ao fenômeno que envolve a saciedade das fêmeas, não promovendo prejuízo em parâmetros de comportamento materno.

Uma vez que a ação esperada do proglumide foi compatível apenas no que se relacionou à caça predatória, decidimos investigar se haveria alguma influência da experiência reprodutiva na modulação do fenômeno de predação. Para isso, desafiámos agudamente fêmeas em diferentes estados reprodutivos com a mesma dose de proglumide utilizada no Experimento 4, e testamos estes animais apenas na presença de insetos. Mediante a análise estatística inicial, observamos que o efeito da experiência reprodutiva se faz consistente em todos os parâmetros comportamentais analisados, porém sem efeito de interação com o desafio farmacológico. De maneira geral podemos dizer que ratas gestantes e lactantes apresentam melhores desempenhos na caça quando comparadas às ratas virgens, independentemente do desafio farmacológico utilizado. Fêmeas lactantes do grupo LS apresentaram menores latências para a captura do segundo inseto quando comparadas às fêmeas do grupo VS. Em relação à captura do terceiro e quarto insetos, fêmeas lactantes desafiadas agudamente com proglumide (LP) apresentaram menores latências para a captura destes insetos quando comparadas com fêmeas virgens desafiadas com veículo. Parâmetros de atividade geral dos animais durante os trinta minutos de teste experimental também foram analisados, e

na análise estatística entre os grupos, não houve diferença estatisticamente significativa, concluindo que o bloqueio inespecífico dos receptores de CCK promove uma modulação apenas no que se diz respeito à captura de insetos, mas não na atividade geral destes animais durante os trinta minutos de teste comportamental.

Foi levantada a hipótese de que a presença dos insetos na experimentação poderia estar agindo como um estímulo ansiogênico nestas fêmeas. Como o experimentador não possuía experiência prática em análise de comportamento similar à ansiedade, foram realizadas análises juntamente com uma das pessoas mais experientes nesta área de estudo atualmente, Prof. Dr. Joseph Lonstein, no *Neuroscience Program* da *Michigan State University*, Estados Unidos. Para fins didáticos, usaremos o termo “ansiedade” para relatar fenômenos relacionados ao comportamento similar à ansiedade em ratas, visto que nos animais não é possível avaliar o componente “psicológico”.

O Experimento 6 foi dividido em análise de comportamento materno mediante à estímulo farmacológico ansiogênico, e teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE) para análise de ansiedade. Apesar de não existir nenhum trabalho científico relatando os efeitos do CGRP em comportamento de ratas lactantes, esperávamos que o peptídeo seria capaz de inibir o comportamento materno, e o antagonista α -CGRP seria capaz de causar uma ação de melhora nos cuidados maternos, visto que teria ação ansiolítica, de acordo com a literatura (SINK et al., 2011, 2013). Apenas no comportamento de amamentar, houve diferença entre os grupos na comparação estatística, sendo o grupo α -CGRP o que gastou menos tempo amamentando seus filhotes quando comparado ao grupo controle VE. Em relação aos parâmetros de atividade geral das fêmeas gestantes, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Era esperado que a atividade exploratória diminuísse, visto que o CGRP diminui a atividade motora, (KOVÁCS et al., 1999) podendo inclusive causar catalepsia (CLEMENTI et al., 1992; JOLICOEUR et al., 1992).

O período de separação total da mãe e dos filhotes foi de 1 hora e 30 minutos. Apenas a separação por si só já seria capaz de aumentar os níveis de ansiedade materna e prejudicar o comportamento. Por outro lado, o contato com os filhotes possui uma ação ansiolítica sobre a mãe (SMITH; LONSTEIN, 2008). Tal efeito poderia ter sido maior do que o efeito da própria droga na modulação do

comportamento materno neste paradigma comportamental, atenuando a ação ansiogênica do CGRP, e desta forma não houve um prejuízo tão intenso quanto o esperado.

As vias neurais responsáveis por estímulos ansiogênicos em machos e fêmeas são muito similares, porém nas fêmeas a atividades dessas vias pode estar modificada devido às flutuações hormonais e neuroquímicas que ocorrem ao longo do período de gestação e de lactação. Tais flutuações aumentam a motivação e o comportamento materno, o que certamente contribui com a diminuição dos níveis de ansiedade e faz com que drogas utilizadas durante esta fase tenham ação tão diferente em relação às mesmas doses utilizadas em machos.

Os dados referentes ao teste de comportamento de ansiedade não revelaram diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos, foram consistentes em relação à permanência do animal nos braços fechados, porém em relação à permanência nos braços abertos há apenas uma tendência da rata lactante tratada com CGRP permanecer menos tempo explorando os braços abertos do aparato. A mesma dose de CGRP utilizada em machos foi suficiente para inibir a exploração dos braços abertos (SINK et al., 2011, 2013). Sabe-se que animais que passam mais tempo explorando os braços abertos apresentam menos comportamento relacionado à ansiedade. Ratas lactantes que não apresentam contato recente com seus filhotes apresentam uma redução no tempo gasto explorando os braços abertos no LCE (LONSTEIN, 2007). Neste caso, procuramos deixar as mães com os filhotes todo o tempo, apenas para verificar a ação da droga *per se*, a separação deu-se apenas no momento da administração da droga, e nos 10 minutos de teste comportamental no LCE.

Com a aquisição de conhecimentos e experiência prática no que se diz respeito à fenômenos que modulam a ansiedade dos animais, seria de extremo contribuição a realização de estudos complementares futuramente, testando apenas se a presença do inseto poderia influenciar no aumento da ansiedade em ratas lactantes.

Futuras pesquisas poderiam avaliar se os mecanismos adaptativos aqui discutidos poderiam influenciar as chances de sobrevivência dos filhotes na natureza. Os mecanismos neurais envolvidos neste processo são importantes para a fêmea ser capaz de balancear entre seus cuidados básicos de subsistência e o seu

sucesso reprodutivo, que em consequências mais abrangentes pode resultar na manutenção de sua espécie na natureza (HRDY, 1999).

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

✎ A presença de maravalha na caixa de experimentação promove uma melhoria na capacidade da rata lactante na expressão do comportamento materno. O fato do teste comportamental não ser realizado na caixa moradia não parece influenciar a expressão do comportamento materno em ratas lactantes, desde que haja uma habituação prévia para minimizar o efeito de “novidade”.

✎ Há um prejuízo nos cuidados maternos e um aumento na caça predatória em animais pré-tratados com injeções periféricas de progesterona ao final do período gestacional e desafiados com morfina durante a lactação.

✎ A injeção central de progesterona na PAGrl promove a inibição da expressão de determinados tipos de comportamento materno, como cifose fisiológica e CMT, porém sem que haja influência em parâmetros de atividade geral do animal, bem como em caça predatória.

✎ O bloqueio periférico não seletivo dos receptores de CCK promove uma melhoria na expressão de determinados comportamentos relacionados aos cuidados com os filhotes, como número de buscas de filhotes, amamentação e cifose fisiológica, porém sem alterar parâmetros de atividade geral e predação durante a realização do teste de seleção comportamental.

✎ A experiência reprodutiva promove uma melhora nos comportamentos relacionados à caça predatória mesmo em fêmeas com bloqueio não seletivo dos receptores de CCK, sem alterar parâmetros de atividade geral no que se refere ao teste de comportamento predatório.

✎ O estímulo ansiogênico agudo e central no vBST de ratas lactantes não foi capaz de promover alterações relacionadas ao comportamento materno, bem como em parâmetros de atividade geral destes animais. A estimulação ansiogênica central também não foi capaz de alterar parâmetros de análise de comportamento similar à ansiedade em ratas lactantes.

REFERÊNCIAS

AIYAR, N.; RAND, K. E.; ISHOUBAGY, N. A.; ZENG, Z.; ADAMOU, J. E.; BERGSMA, D. J.; Li, Y. A cDNA encoding the calcitonin gene-related peptide type 1 receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 19, p. 11325-9. 1996.

ALTSHULER, L. L.; HENDRICK, V.; COHEN, L. S. An Update on Mood and Anxiety Disorders During Pregnancy and the Postpartum Period. **Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry**, v. 2, n. 6, p. 217-222. 2000.

AMARA, S. G.; JONAS, V.; ROSENFELD, M. G.; ONG, E. S.; EVANS, R. M. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. **Nature**, v. 298, n. 5871, p. 240-4. 1982.

BAUMANS, V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. **ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 46, n. 2, p. 162-70. 2005.

BENAROYA-MILSHTEIN, N.; HOLLANDER, N.; APTER, A.; KUKULANSKY, T.; RAZ, N.; WILF, A.; YANIV, I.; PICK, C. G. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. **The European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 1341-7. 2004.

BREITKOPF, C. R.; PRIMEAU, L. A.; LEVINE, R. E.; OLSON, G. L.; WU, Z. H.; BERENSON, A. B. Anxiety symptoms during pregnancy and postpartum. **Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology**, v. 27, n. 3, p. 157-62. 2006.

BRENES SÁENZ, J. C.; VILLAGRA, O. R.; FORNAGUERA TRÍAS, J. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. **Behavioural Brain Research**, v. 169, n. 1, p. 57-65. 2006.

BRIDGES, R.; ZARROW, M. X.; GANDELMAN, R.; DENENBERG, V. H. Differences in maternal responsiveness between lactating and sensitized rats. **Developmental Psychobiology**, v. 5, n. 2, p. 123-7. 1972.

BRIDGES, R. S.; GRIMM, C. T. Reversal of morphine disruption of maternal behavior by concurrent treatment with the opiate antagonist naloxone. **Science**, v. 218, n. 4568, p. 166-8. 1982.

BROWN, M. R.; GRAY, T. S. Peptide injections into the amygdala of conscious rats: effects on blood pressure, heart rate and plasma catecholamines. **Regulatory Peptides**, v. 21, n. 1-2, p. 95-106. 1988.

BRUNTON, P. J.; RUSSELL, J. A. Endocrine induced changes in brain function during pregnancy. **Brain Research**, v. 1364, p. 198-215. 2010.

BYRNES, E. M.; NEPHEW, B. C.; BRIDGES, R. S. Neuroendocrinal and behavioral adaptations following reproductive experience in the female rat. In: BRIDGES, R. S. (Ed). **Neurobiology of the parental brain**, Burlington, MA, Elsevier, 2007. p. 509-517.

CARVALHO-FREITAS, M. I. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; TEODOROV, E.; NASELLO, A. G.; PALERMO-NETO, J.; FELICIO, L. F. Reproductive experience modifies dopaminergic function, serum levels of prolactin, and macrophage activity in female rats. **Life Sciences**, v. 81, n. 2, p. 128-36. 2007.

CARVALHO-FREITAS, M. I. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; MAIORKA, P. C.; PALERMO-NETO, J.; FELICIO, L. F. Prolactin differentially modulates the macrophage activity of lactating rats: possible role of reproductive experience. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 89, n. 1, p. 38-45. 2011.

CASADA, J. H.; DAFNY, N. Responses of neurons in bed nucleus of the stria terminalis to microiontophoretically applied morphine, norepinephrine and acetylcholine. **Neuropharmacology**, v. 32, n. 3, p. 279-84. 1993.

CHAPILLON, P.; MANNECHÉ, C.; BELZUNG, C.; CASTON, J. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. **Behavior Genetics**, v. 29, n. 1, p. 41-6. 1999.

CHAURAND, J. P.; VERGNES, M.; KARLI, P. Substance grise centrale du mésencéphale et comportement d'agression interspécifique du rat. **Physiology & Behavior**, v. 9, n. 3, p. 475-481. 1972.

CLEMENTI, G.; GRASSI, M.; VALERIO, C.; PRATO, A.; FIORE, C. E.; DRAGO, F. Effects of calcitonin gene-related peptide on extrapyramidal motor system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 42, n. 3, p. 545-8. 1992.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E. .; 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, n. 1, p. 17-28. 2003.

COOPER, S. J.; DOURISH, C. T. Multiple cholecystokinin (CCK) receptors and CCK-monoamine interactions are instrumental in the control of feeding. **Physiology & Behavior**, v. 48, n. 6, p. 849-57. 1990.

CRAWLEY, J. N. Cholecystokinin-dopamine interactions. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, n. 6, p. 232-6. 1991.

CRAWLEY, J. N.; CORWIN, R. L. Biological actions of cholecystokinin. **Peptides**, v. 15, n. 4, p. 731-55. 1994.

CRUZ, A. M. **Modulação opioidérgica na seleção comportamental após o parto**. 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CRUZ, A. M.; MAIORKA, P. C.; CANTERAS, N. S.; SUKIKARA, M. H.; FELICIO, L.F. Morphine treatment during pregnancy modulates behavioral selection in lactating rats. **Physiology & Behavior**, v. 101, n. 1, p. 40-44. 2010.

CRUZ, A. M. **Motivação e ansiedade em fêmeas: aspectos farmacológicos e reprodutivos.** 2013. 147 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

DARNAUDÉRY, M.; PEREZ-MARTIN, M.; DEL FAVERO, F.; GOMEZ-ROLDAN, C.; GARCIA; SEGURA, L. M.; MACCARI, S. Early motherhood in rats is associated with a modification of hippocampal function. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 7, p. 803-12. 2007.

DENENBERG, V. H.; KARAS, G. G. Effects of differential infantile handling upon weight gain and mortality in the rat and mouse. **Science**, v. 130, n. 3376, p. 629-30. 1959.

DI ANGELANTONIO, S.; GINIATULLIN, R.; COSTA, V.; SOKOLOVA, E.; NISTRI, A. Modulation of neuronal nicotinic receptor function by the neuropeptides CGRP and substance P on autonomic nerve cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 6, p. 1061-73. 2003.

DONG, H. W.; PETROVICH, G. D.; SWANSON, L. W. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. **Brain Research Reviews**, v. 38, n. 1-2, p. 192-246. 2001.

DONG, H. W.; SWANSON, L. W. Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 468, n. 2, p. 277-98. 2004.

DONG, H. W.; SWANSON, L. W. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, anteromedial area: cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and behavioral aspects of energy balance. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 494, n. 1, p. 142-78. 2006.

FARIS, P. L.; KOMISARUK, B. R.; WATKINS, L. R.; MAYER, D. J. Evidence for the neuropeptide cholecystokinin as an antagonist of opiate analgesia. **Science**, v. 219, n. 4582, p. 310-2. 1983.

FELICIO, L. F.; MANN, P. E.; BRIDGES, R. S. Intracerebroventricular cholecystokinin infusions block beta-endorphin-induced disruption of maternal behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 39, n. 1, p. 201-4, maio. 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, 2008, v. 1, p. 75-82, 2008.

FLEMING, A. S. Control of food intake in the lactating rat: role of suckling and hormones. **Physiology & Behavior**, v. 17, n. 5, p. 841-8. 1976.

FLEMING, A. S. Maternal responsiveness in human and animal mothers. **New Directions for Child Development**, n. 43, p. 31-47. 1989.

FLEMING, A. S.; LUEBKE, C. Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females. **Physiology & Behavior**, v. 27, n. 5, p. 863-8. 1981.

FLEMING, A. S.; SARKER, J. Experience-hormone interactions and maternal behavior in rats. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 6, p. 1165-73. 1990.

FERGUSON, T. R.; FERGUSON, T.; VICTORIA, L.; NORKUNAS, T.; WORTHINGTON-STONEMAN, D.; JONES, C.; FRENTH, K.; SKURKA, D.; CHAN, C.; BRANOVA, 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, 34, 2008, Washington DC, n. 794.4, 2008.

FOX, C.; MERALI, Z.; HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 1, p. 1-8, 25. 2006.

FRISKE, J. E.; GAMMIE, S. C. Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. **Physiology & Behavior**, v. 85, n. 2, p. 187-94, 2. 2005.

GARLAND, H. O.; ATHERTON, J. C.; BAYLIS, C.; MORGAN, M. R.; MILNE, C. M. Hormone profiles for progesterone, oestradiol, prolactin, plasma renin activity, aldosterone and corticosterone during pregnancy and pseudopregnancy in two strains of rat: correlation with renal studies. **The Journal of Endocrinology**, v. 113, n. 3, p. 435-44. 1987.

GATEWOOD, J. D. MORGAN, M. D.; EATON, M.; MCNAMARA, I. M.; STEVENS, L. F.; MACBETH, A. H.; MEYER, E. A. A.; LOMAS, L. M.; KOZUB, F. J.; LAMBERT, K. G.; KINSLEY, C. H. Motherhood mitigates aging-related decrements in learning and memory and positively affects brain aging in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 66, n. 2, p. 91-8. 2005.

HARD, E.; HANSEN, S. Reduced fearfulness in the lactating rat. **Physiology & Behavior**, v. 35, n. 4, p. 641-3. 1985.

HAUSER, H.; GANDELMAN, R. Lever pressing for pups: evidence for hormonal influence upon maternal behavior of mice. **Hormones and Behavior**, v. 19, n. 4, p. 454-68. 1985.

HOLST, N.; JENSSEN, T. G.; BURHOL, P. G.; JORDE, R.; MALTAU, J. M.; HAUG, E. Gut peptides in lactation. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 93, n. 2, p. 188-93. 1986.

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

HRDY, S. B. Mothers and others: the evolutionary origins of mutual understanding. Cambridge, MA, Harvard University Press, 2011.

HUCKE, E. E.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; FLORIO, J. C.; FELICIO, L. F. Reproductive experience reduces striatal dopaminergic responses in freely moving female rats. **Neuroreport**, v. 9, n. 16, p. 3589-93. 1998.

HUCKE, E. E.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; SIDER, L. H.; FELICIO, L. F. Reproductive experience modulates dopamine-related behavioral responses. **Pharmacology Biochemistry and behavior**, v. 68, n. 3, p. 575-82. 2001.

JOLICOEUR, F. B.; MENARD, D.; FOURNIER, A.; ST-PIERRE, S. Structure-activity analysis of CGRP's neurobehavioral effects. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 657, p. 155-63. 1992.

KALIN, N. H.; SHELTON, S. E.; FOX, A. S.; OAKES, T. R.; DAVIDSON, R. J. Brain regions associated with the expression and contextual regulation of anxiety in primates. **Biological Psychiatry**, v. 58, n. 10, p. 796-804. 2005.

KLEIN, M. O. **Papel dos receptores opióides m e k da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na seleção comportamental durante a lactação**. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KOVÁCS, A.; BIRÓ, E.; SZELECZKY, I.; TELEGDY, G. Role of endogenous CRF in the mediation of neuroendocrine and behavioral responses to calcitonin gene-related peptide in rats. **Neuroendocrinology**, v. 62, n. 4, p. 418-24. 1995.

KOVÁCS, A.; TELEGDY, G.; TÓTH, G.; PENKE, B. Neurotransmitter-mediated open-field behavioral action of CGRP. **Life Sciences**, v. 64, n. 9, p. 733-40. 1999.

KOVÁCS, A.; TELEGDY, G. Effects of intracerebroventricular administration of calcitonin gene-related peptide on passive avoidance behaviour in rats. **Neuropeptides**, v. 23, n. 1, p. 51-4. 1992.

KOVÁCS, A.; TELEGDY, G. CGRP prevents electroconvulsive shock-induced amnesia in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 47, n. 1, p. 121-5. 1994.

KOVÁCS, A.; TELEGDY, G. Behavioural impairment induced by calcitonin gene-related peptide (CGRP) antiserum in passive avoidance reflex in rats. **Neuropeptides**, v. 26, n. 4, p. 233-6. 1994.

KRAHN, D. D.; GOSNELL, B. A.; LEVINE, A. S.; MORLEY, J. E. Effects of calcitonin gene-related peptide on food intake. **Peptides**, v. 5, n. 5, p. 861-4, 1984.

LEE, Y.; DAVIS, M. Role of the hippocampus, the bed nucleus of the stria terminalis, and the amygdala in the excitatory effect of corticotropin-releasing hormone on the acoustic startle reflex. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 16, p. 6434-46. 1997.

LENZ, H. J.; MORTRUD, M. T.; RIVIER, J. E.; BROWN, M. R. Central nervous system actions of calcitonin gene-related peptide on gastric acid secretion in the rat. **Gastroenterology**, v. 88, n. 2, p. 539-44. 1985.

LEON, M.; WOODSIDE, B. Energetic limits on reproduction: maternal food intake. **Physiology & Behavior**, v. 30, n. 6, p. 945-57. 1983.

LI, X. F.; BOWE, J. E.; MITCHELL, J. C.; BRAIN, S. D.; LIGHTMAN, S. L.; O'BYRNE, K. T. Stress-induced suppression of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator in the female rat: a novel neural action for calcitonin gene-related peptide. **Endocrinology**, v. 145, n. 4, p. 1556-63. 2004.

LINDÉN, A.; UVNÄS-MOBERG, K.; ENEROTH, P.; SODERSTEN, P. Stimulation of maternal behaviour in rats with cholecystinin octapeptide. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 1, n. 6, p. 389-92. 1989.

LINDÉN, A.; ERIKSSON, M.; HANSEN, S.; UVNÄS-MOBERG, K. Suckling-induced release of cholecystokinin into plasma in the lactating rat: effects of abdominal vagotomy and lesions of central pathways concerned with milk ejection. **The Journal of Endocrinology**, v. 127, n. 2, p. 257-63. 1990.

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. **J. Neurosci.**, v. 17, n. 9, 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, n. 1, p. 21-35. 1998.

LONSTEIN, J. S.; SIMMONS, D. A.; STERN, J. M. Functions of the caudal periaqueductal gray in lactating rats: kyphosis, lordosis, maternal aggression, and fearfulness. **Behavioral Neuroscience**, v. 112, n. 6, p. 1502-18. 1998.

LONSTEIN, J. S.; SIMMONS, D. A.; STERN, J. M. Functions of the caudal periaqueductal gray in lactating rats: kyphosis, lordosis, maternal aggression, and fearfulness. **Behavioral Neuroscience**, v. 112, n. 6, p. 1502-18. 1998.

LONSTEIN, J. S.; GAMMIE, S. C. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 8, p. 869-88. 2002.

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.

LONSTEIN, J. S.; MORRELL, J. I. Neuroendocrinology and Neurochemistry of Maternal Motivation and Behavior. In: BLAUSTEIN, J. D. (Ed) Handbook of Neurochemistry and Molecular Biology – Behavioral Neurobiology, v. 18, p. 195-245, Springer Press. 2007.

LONSTEIN, J. S. Regulation of anxiety during the postpartum period. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 28, n. 2-3, p. 115-41. 2007.

LOVICK, T. A.; ADAMEC, R. The Periaqueductal Gray (PAG). **Neural Plasticity**, v. 2009, p. 360907. 2009.

LU, B.; FU, W. M.; GREENGARD, P.; POO, M. M. Calcitonin gene-related peptide potentiates synaptic responses at developing neuromuscular junction. **Nature**, v. 363, n. 6424, p. 76-9. 1993.

LUPOLI, B.; JOHANSSON, B.; UVNÄS-MOBERG, K.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Effect of suckling on the release of oxytocin, prolactin, cortisol, gastrin, cholecystokinin, somatostatin and insulin in dairy cows and their calves. **The Journal of dairy research**, v. 68, n. 2, p. 175-87. 2001.

MACBETH, A. H.; GAUTREAUX, C.; LUINE, V. N. Pregnant rats show enhanced spatial memory, decreased anxiety, and altered levels of monoaminergic neurotransmitters. **Brain Research**, v. 1241, p. 136-47. 2008.

MACBETH, A. H.; LUINE, V. N. Changes in anxiety and cognition due to reproductive experience: a review of data from rodent and human mothers. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 3, p. 452-67. 2010.

MANN, P. Finasteride delays the onset of maternal behavior in primigravid rats. **Physiology & Behavior**, v. 88, n. 4-5, p. 333-338. 2006.

MANN, P. E.; FELICIO, L. F.; BRIDGES, R. S. Investigation into the Role of Cholecystokinin (CCK) in the Induction and Maintenance of Maternal Behavior in Rats. **Hormones and Behavior**, v. 29, n. 3, p. 392-406. 1995.

MANN, P. E.; GERVAIS, K. J. Environmental enrichment delays pup-induced maternal behavior in rats. **Developmental Psychobiology**, v. 53, n. 4, p. 371-82. 2011.

MATTSON, B. J.; WILLIAMS, S.; ROSENBLATT, J. S.; MORRELL, J. I. Comparison of two positive reinforcing stimuli: pups and cocaine throughout the postpartum period. **Behavioral Neuroscience**, v. 115, n. 3, p. 683-94. 2001.

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

MAZZOCCHI, G.; MUSAJO, F.; NERI, G.; GOTTARDO, G.; NUSSDORFER, G. G. Adrenomedullin stimulates steroid secretion by the isolated perfused rat adrenal gland in situ: comparison with calcitonin gene-related peptide effects. **Peptides**, v. 17, n. 5, p. 853-7. 1996.

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, n. 4, p. 501-5. 2001.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S.; FELICIO, L. F. A role for the periaqueductal grey in opioidergic inhibition of maternal behaviour. **The European Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 667-74. 2003.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; CANTERAS, N. S.; SUKIKARA, M. H.; NASELLO, A. G.; MACKOWIAK, I. I.; FELICIO, L. F. Periaqueductal gray cholecystokinin infusions block morphine-induced disruption of maternal behavior. **Peptides**, v. 28, n. 3, p. 657-662. 2007.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; FELICIO, L. F. Differential Role of Cholecystokinin Receptor Subtypes in Opioid Modulation of Ongoing Maternal Behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 64, n. 1, p. 165-169. 1999.

MOHAMMED, A. H.; ZHU, S. W.; DARMOPIL, S.; HJERLING-LEFFLER, J.; ERNFORS, P.; WINBLAD, B.; DIAMOND, M. C.; ERIKSSON, P. S.; BOGDANOVIC, N. Environmental enrichment and the brain. **Progress in Brain Research**, v. 138, p. 109-33. 2002.

MORAN, T. H.; ROBINSON, P. H.; GOLDRICH, M. S.; MCHUGH, P. R. Two brain cholecystokinin receptors: implications for behavioral actions. **Brain Research**, v. 362, n. 1, p. 175-9. 1986.

MOTA-ORTIZ, S. R.; SUKIKARA, M. H.; FELICIO, L. F.; CANTERAS, N. S. Afferent Connections to the Rostrolateral Part of the Periaqueductal Gray: A Critical Region Influencing the Motivation Drive to Hunt and Forage. **Neural Plasticity**, v. 2009, p. 1-11, 2009.

MORRELL, J. I.; WAGNER, C. K.; MALIK, K. F.; LISCIOTTO, C. A. Estradiol receptor RNA: neuroanatomy and regulation in three physiological models. Neurobiological effects of sex steroid hormones. Micevych, P. E.; Hammer, R. P. (Ed). New York, NY: Cambridge University Press; p. 57-84. 1995.

MULLE, C.; BENOIT, P.; PINSET, C.; ROA, M.; CHANGEUX, J. P. Calcitonin gene-related peptide enhances the rate of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor in cultured mouse muscle cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 15, p. 5728-32. 1988.

MUTT, V. Historical perspectives on cholecystokinin research. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 713, p. 1-10, 23. 1994.

NOBLE, F.; WANK, S. A.; CRAWLEY, J. N.; BRADWEJN, J.; SEROOGY, K. B.; HAMON, M.; ROQUES, B. P. International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 4, p. 745-81. 1999.

NUMAN, M. A lesion and neuroanatomical tract-tracing analysis of the role of the bed nucleus of the stria terminalis in retrieval behavior and other aspects of maternal responsiveness in rats. **Developmental Psychobiology**, v. 29, n. 1, p. 23-51. 1996.

NUMAN, M.; INSEL, T. R. The Neurobiology of Parental Behavior. New York: Springer-Verlag. 2003.

OLAZÁBAL, D. E.; MORRELL, J. I. Juvenile rats show reduced c-fos activity in neural sites associated with aversion to pups and inhibition of maternal behavior. **Behavioral Neuroscience**, v. 119, n. 4, p. 1097-110. 2005.

OTTONI, E. B. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, v. 32, n. 3, p. 446-9. 2000.

PAUL, S. M.; PURDY, R. H. Neuroactive steroids. **FASEB Journal**, v. 6, n. 6, p. 2311-22. 1992.

PAWLUSKI, J. L.; GALEA, L. A. M. Hippocampal morphology is differentially affected by reproductive experience in the mother. **Journal of Neurobiology**, v. 66, n. 1, p. 71-81. 2006.

PAWLUSKI, J. L.; GALEA, L. A. M. Reproductive experience alters hippocampal neurogenesis during the postpartum period in the dam. **Neuroscience**, v. 149, n. 1, p. 53-67. 2007.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. San Diego: Academic Press; 1998.

PECILE, A.; GUIDOBONO, F.; NETTI, C.; SIBILIA, V.; BIELLA, G.; BRAGA, P. C. Calcitonin gene-related peptide: antinociceptive activity in rats, comparison with calcitonin. **Regulatory Peptides**, v. 18, n. 3-4, p. 189-99. 1987.

PEREIRA, M.; URIARTE, N.; AGRATI, D.; ZULUAGA, M. J.; FERREIRA, A. Motivational aspects of maternal anxiolysis in lactating rats. **Psychopharmacology**, v. 180, n. 2, p. 241-8. 2005.

POYNER, D. R. Calcitonin gene-related peptide: multiple actions, multiple receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 56, n. 1, p. 23-51. 1992.

REZAYAT, M.; RAHNAVARD, A.; ZARRINDAST, M. R. Role of cholecystokinin receptors in induction of antinociception in hot-plate test. **Pharmacology & Toxicology**, v. 87, n. 2, p. 58-62. 2000.

ROSENBLATT, J. S. Prepartum and postpartum regulation of maternal behaviour in the rat. **Ciba Foundation Symposium**, n. 33, p. 17-37. 1975.

ROSENBLATT, J. S.; SIEGEL, H. I.; MAYER, A. D. Hormonal basis of parenting. Handbook of parenting v. 2 Biology and Ecology of Parenting. Bornstein, M. H. New Jersey, Hove UK: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers Mahwah. 1975

ROSENBLATT, J. S.; WAGNER, C. K.; MORRELL, J. I. Hormonal priming and triggering of maternal behavior in the rat with special reference to the relations between estrogen receptor binding and ER mRNA in specific brain regions. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, n. 5-7, p. 543-52. 1994.

ROSENFELD, M. G.; MERMOD, J. J.; AMARA, S. G.; SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E.; RIVIER, J.; VALE, W. W.; EVANS, R. M. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. **Nature**, v. 304, n. 5922, p. 129-35, 1983.

ROTH, L. L.; ROSENBLATT, J. S. Self-licking and mammary development during pregnancy in the rat. **The Journal of Endocrinology**, v. 42, n. 3, p. 363-78. 1968.

SAMUELS, M. H.; BRIDGES, R. S. Plasma prolactin concentrations in parental male and female rats: effects of exposure to rat young. **Endocrinology**, v. 113, n. 5, p. 1647-54. 1983.

SANYAL, M. K. Secretion of progesterone during gestation in the rat. **The Journal of Endocrinology**, v. 79, n. 2, p. 179-90. 1978.

SEIFERT, H.; CHESNUT, J.; DE SOUZA, E.; RIVIER, J.; VALE, W. Binding sites for calcitonin gene-related peptide in distinct areas of rat brain. **Brain Research**, v. 346, n. 1, p. 195-8. 1985.

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.

SHEEHAN, T. P.; CIRRITO, J.; NUMAN, M. J.; NUMAN, M. Using c-Fos immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, n. 2, p. 337-52. 2000.

SINK, K. S.; WALKER, D. L.; YANG, Y.; DAVIS, M. Calcitonin gene-related peptide in the bed nucleus of the stria terminalis produces an anxiety-like pattern of behavior and increases neural activation in anxiety-related structures. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 5, p. 1802-10. 2011.

SINK, K. S.; RESSLER, K. J.; DAVIS, M.; WALKER, D. L.; CHUNG, A. Anxiogenic effects of CGRP within the BNST may be mediated by CRF acting at BNST CRFR1 receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 243, p. 286-93. 2013.

SKOFITSCH, G.; JACOBOWITZ, D. M. Calcitonin gene-related peptide: detailed immunohistochemical distribution in the central nervous system. **Peptides**, v. 6, n. 4, p. 721-45, 1985.

ŠLAMBEROVÁ, R.; RIMANÓCZY, Á.; RILEY, M. A.; SCHINDLER, C. J.; VATHY, I. Mu-opioid receptors in seizure-controlling brain structures are altered by prenatal morphine exposure and by male and female gonadal steroids in adult rats. **Brain Research Bulletin**, v. 58, n. 4, p. 391-400. 2002.

ŠLAMBEROVÁ, R.; RIMANÓCZY, Á.; CAO, D.; SCHINDLER, C. J.; VATHY, I. Alterations of prenatal morphine exposure in μ -opioid receptor density in hypothalamic nuclei associated with sexual behavior. **Brain Research Bulletin**, v. 65, n. 6, p. 479-485. 2005.

ŠLAMBEROVÁ, R.; SZILÁGYI, B.; VATHY, I. Repeated morphine administration during pregnancy attenuates maternal behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n. 6, p. 565-576. 2001.

SMITH, C.; LONSTEIN, J. Contact with infants modulates anxiety-generated c-fos activity in the brains of postpartum rats. **Behavioural Brain Research**, v. 190, n. 2, p. 193-200. 2008.

STERN, J. M. Trigeminal lesions and maternal behavior in Norway rats: II. Disruption of parturition. **Physiology & Behavior**, v. 60, n. 1, p. 187-90. 1996.

SUKIKARA, M. H. **Participação opioidérgica na seleção de comportamentos próprios da espécie durante a lactação**. 2006. Tese (Doutor em Psicologia) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 9, p. 2583-2589. 2006.

SUKIKARA, M. H. et al. Opiate regulation of behavioral selection during lactation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 87, n. 3, p. 315-320, ago. 2007.

SUKIKARA, M. H.; PLATERO, M. D.; CANTERAS, N. S.; FELICIO, L. F. The periaqueductal gray and its potential role in maternal behavior inhibition in response to predatory threats. **Behavioural Brain Research**, v. 209, n. 2, p. 226-233, jun. 2010.

SUKIKARA, M. H.; CRUZ, A. M.; FELIPPE, É. C. G.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; CANTERAS, N. S.; DE OLIVEIRA, C. A.; FELICIO, L. F. Morphine-Induced Changes in Opioid Sensitivity in Postpartum Females: A Unique Progesterone Response. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 23, n. 11, p. 1134-1138. 2011.

SWANSON, L. W.; MOGENSEN, G. J.; SIMERLY, R. B.; WU, M. Anatomical and electrophysiological evidence for a projection from the medial preoptic area to the “mesencephalic and subthalamic locomotor regions” in the rat. **Brain Research**, v. 405, n. 1, p. 108-22. 1987.

TAKEO, T.; SAKUMA, Y. Diametrically opposite effects of estrogen on the excitability of female rat medial and lateral preoptic neurons with axons to the midbrain locomotor region. **Neuroscience Research**, v. 22, n. 1, p. 73-80. 1995.

TAYA, K.; GREENWALD, G. S. Mechanisms of suppression of ovarian follicular development during lactation in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 5, p. 1090-101, 1982.

WALKER, D. L.; TOUFEXIS, D. J.; DAVIS, M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 199-216. 2003.

WARTELLA, J.; AMORY, E.; LOMAS, L. M.; MACBETH, A.; MCNAMARA, I.; STEVENS, L.; LAMBERT, K. G.; KINSLEY, C. H. Single or multiple reproductive experiences attenuate neurobehavioral stress and fear responses in the female rat. **Physiology & Behavior**, v. 79, n. 3, p. 373-81. 2003.

WATKINS, L. R.; KINSHECK, I. B.; MAYER, D. J. Potentiation of morphine analgesia by the cholecystokinin antagonist proglumide. **Brain Research**, v. 327, n. 1-2, p. 169-80. 1985.

YIM, A. J.; MIRANDA-PAIVA, C.M.; FLÓRIO, J.C.; OLIVEIRA, C.A.; NASELLO, A.G.; FELICIO, L. F. A comparative study of morphine treatment regimen prior to mating and during late pregnancy. **Brain Research Bulletin**, v. 68, n. 5, p. 384-391. 2006.

APÊNDICE A

Localização das Injeções na região da PAGrl (Experimento 3), posteriores ao Bregma, (A) -5,80 mm; (B) -6,04 mm; (C) -6,30 mm; (D) -6,72 mm e (E) -6,80. Aq: aqueduto mesencefálico; EW: núcleo de Edinger-Westphal (adaptado de Paxinos e Watson, 1998).

APÊNDICE B

Localização das Injeções na região do vBST (Experimento 6), posteriores ao Bregma, (A) -0,26 mm; (B) -0,30 mm; (C) -0,40 mm e (D) -0,80 mm (adaptado de Paxinos e Watson, 1998).

APÊNDICE C

Figura Cirurgia Estereotáxica, sequência de procedimentos para inserção da cânula guia na PAGrl

Fonte: Cruz (2013)

APÊNDICE D

Lamber filhotes

Cifose fisiológica

Busca de filhotes

Comendo insetos

Atividade exploratória

APÊNDICE E

Elsevier Editorial System(tm) for Hormones and Behavior
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Progesterone pretreatment reveals inhibitory effects of opioids on behavior in lactating rats

Article Type: Original Research Article

Keywords: maternal behavior; predation; progesterone; opioid

Corresponding Author: Mrs. Aline Mello Cruz, MSc

Corresponding Author's Institution: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

First Author: Aline Mello Cruz, MSc

Order of Authors: Aline Mello Cruz, MSc; Marcia H Sukikara, PhD; Luciano F Felicio, PhD

Abstract: Changes in plasma progesterone levels during late pregnancy are a determining factor in the expression of maternal behavior during lactation. Previous studies showed that mild opioidergic stimulation during late pregnancy makes lactating females more sensitive to opioidergic-induced inhibition of maternal behavior and more willing to display hunting behavior. Such previous behaviorally meaningful opioidergic stimulation also selectively increased serum progesterone levels. The present study tested whether progesterone treatment during late pregnancy interferes with the display of maternal behavior and behavioral selection during lactation. In Experiment 1, rats were treated with progesterone (400 and 500 µg per day) from the 17th to 22nd day of pregnancy. The lowest progesterone dose did not interfere with pregnancy or parturition, and this dose was used in Experiments 2 and 3, in which the rats were treated with progesterone (P; subcutaneous [s.c.]) or peanut oil (O) for 5 days beginning on pregnancy day 17. On day 5 of lactation, dams were challenged with morphine (M; 1.5 mg/kg, s.c.) to yield the OM and PM groups or saline (S; s.c.) to yield the OS and PS groups. The rats were then tested for maternal care (Experiment 2) or behavioral selection with pups and cockroaches (Experiment 3). Animals treated with progesterone during late pregnancy and challenged with morphine during lactation exhibited significantly decrease in maternal behavior in both Experiments 2 and 3. Predatory hunting was not modified by previous progesterone treatment. These results indicate that sensitivity to opioidergic-mediated inhibition of maternal behavior is enhanced by prepartum progesterone administration.

Aline de Mello Cruz, DVM, MSc

(Corresponding Author)

Av. Prof. Orlando M. Paiva, 87

Cidade Universitária

05508-000 São Paulo, SP

Tel.: +55 11 3091-1409 Fax: +55 11 3091-7829

e-mail: melloap@gmail.com

São Paulo February 17th, 2011

Editor: K. Wallen

Dear Doctor Wallen,

Attached you will find our manuscript entitled "**Progesterone pretreatment reveals inhibitory effects of opioids on behavior in lactating rats**" that we would like to submit for possible publication in *Hormones and Behavior*. The data reported in the manuscript suggest that opioid-induced mechanisms involving endocrine changes during pregnancy could influence post-partum behavior. The data are original and unpublished. The animals used in this study were maintained in accordance with the guidelines of COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), similar to the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA.

Thanks for considering our manuscript for publication in *Hormones and Behavior*.

Yours Sincerely,

Aline de Mello Cruz, DVM, MSc.

Reviewer suggestions, in order of preference:

[1] Barbara Woodside

Department of Psychology, Faculty of Arts and Science, Concordia University

barbara.woodside@concordia.ca

[2] Marie Odile Monier Chelini

Institute of Psychology, University of São Paulo (USP)

marodiche@gmail.com

[3] Ana Carolina Inhasz Kiss

Department of Physiology, State University of Londrina (UEL)

ana.inasz@gmail.com

[4] Maria Martha Bernardi

Department of Pharmacology, Paulista University (UNIP)

marthabernardi@gmail.com

< Sensitivity to opioidergic-mediated inhibition of maternal behavior is enhanced by prepartum progesterone administration. < Plasma progesterone levels during late pregnancy may modulate behavioral selection during lactation.

Progesterone pretreatment reveals inhibitory effects of opioids on behavior in lactating rats

Cruz, A.M.^a; Sukikara, M.H.^b and Felicio, L.F.^a

*^aDepartamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade de São Paulo, Brasil.*

*^bLaboratório de Bases Neurais do Comportamento, Universidade Cidade de São
Paulo,
Brasil..*

Running Title: Progesterone and opioid effects on behavior

Abstract

Changes in plasma progesterone levels during late pregnancy are a determining factor in the expression of maternal behavior during lactation. Previous studies showed that mild opioidergic stimulation during late pregnancy makes lactating females more sensitive to opioidergic-induced inhibition of maternal behavior and more willing to display hunting behavior. Such previous behaviorally meaningful opioidergic stimulation also selectively increased serum progesterone levels. The present study tested whether progesterone treatment during late pregnancy interferes with the display of maternal behavior and behavioral selection during lactation. In Experiment 1, rats were treated with progesterone (400 and 500 µg per day) from the 17th to 22nd day of pregnancy. The lowest progesterone dose did not interfere with pregnancy or parturition, and this dose was used in Experiments 2 and 3, in which the rats were treated with progesterone (P; subcutaneous [s.c.]) or peanut oil (O) for 5 days beginning on pregnancy day 17. On day 5 of lactation, dams were challenged with morphine (M; 1.5 mg/kg, s.c.) to yield the OM and PM groups or saline (S; s.c.) to yield the OS and PS groups. The rats were then tested for maternal care (Experiment 2) or behavioral selection with pups and cockroaches (Experiment 3). Animals treated with progesterone during late pregnancy and challenged with morphine during lactation exhibited significantly decrease in maternal behavior in both Experiments 2 and 3. Predatory hunting was not modified by previous progesterone treatment. These results indicate that sensitivity to opioidergic-mediated inhibition of maternal behavior is enhanced by prepartum progesterone administration.

Keywords: maternal behavior, predation, progesterone, opioid

1. Introduction

Pregnancy is characterized by an increase in the levels of circulating female sex steroids, particularly estradiol and progesterone (Bridges, 1984). The actions of these steroids on the brain during pregnancy are very well established, especially in the preparation of neural circuitry for the expression of maternal behavior after birth (Bridges, 1984; Numan, 2007).

In mammals, the survival time of a newborn exclusively depends on maternal skills in feeding, heating, and protecting their offspring. Physiological changes that occur just before and just after parturition are critical for the mother to develop the ability to maintain the appropriate care of their offspring (Numan, 1984).

Endocrine factors could be responsible for the induction and maintenance of maternal behavior. Progesterone plays an important role in this context. This hormone is elevated during pregnancy and decreases abruptly just before the onset of parturition (Bridges, 1984). Such changes in plasma hormone levels are responsible for maternal care and could be involved in other physiological roles, such as predation (Sukikara et al., 2011).

The female steroid hormones estrogen and progesterone are produced in large amounts during pregnancy and increase as pregnancy progresses. These hormones have essential peripheral actions to maintain pregnancy and ensure safe delivery at term. They also have important actions on the brain during pregnancy, generally through interactions with neuropeptide systems in the brain or through modulating the actions of circulating peptide hormones in the brain (Brunton and Russell, 2010).

Preventing progesterone withdrawal at the end of pregnancy by administering exogenous progesterone prevents oxytocin activation through the actions of supraoptic

and tractus solitarius neurons during parturition (Antonijevic et al., 2000). Some studies indicated that endogenous opioids in both the mother and infant are important for the emotional regulation of the infant and attachment (Weller and Feldman, 2003; Barr et al., 2008; Schino and Troisi, 2009). If this system is altered by prior exposure to opiates, then postpartum maternal-offspring interactions could be affected (Johnson et al., 2011). The normal onset and maintenance of maternal behavior in rats is regulated by endogenous opioids (Bridges and Grimm, 1982).

Repeated treatment with morphine during late pregnancy sensitizes dams to the inhibitory effects of opioids on maternal behavior, reducing maternal care. This phenomenon could occur when morphine is administered systemically or centrally in areas that modulate maternal care, such as the periaqueductal gray (Miranda-Paiva et al., 2001; Miranda-Paiva et al., 2003; Miranda-Paiva et al., 2007).

Plasticity in opioidergic transmission may provide a substrate for the versatility and adaptations required for a dam during the postpartum period to inhibit maternal behavior and stimulate foraging (Sukikara et al., 2007; Cruz et al., 2010).

Insect predation is a fundamental motivated behavior in many rodents, including rats. It is an interesting paradigm that has been used to study patterns of innate predatory hunting. Cockroaches have been considered a suitable prey because they are relatively innocuous and easily overcome and appear very palatable, with both hunting and subsequent consumption contributing to high hedonic value associated with the predatory activity (Comoli et al., 2003; Comoli et al., 2005).

In our previous study, the neural basis of inhibition of maternal behavior in response to low morphine doses in morphine-experienced dams was examined. We found that morphine treatment induced a behavioral switch from maternal to predatory

behavior. Morphine-challenged dams that were tested in an environment that contained both pups and roaches, which served as prey, clearly preferred hunting rather than nursing. Opiates modulated the dam's motivational drive to forage and hunt. Previous studies suggested that the brain structures involved in behavioral selection are plastic and adaptive (Sukikara et al., 2006; Sukikara et al., 2007).

Highly adaptative mechanisms increase the chances of survival in lactating animals in food-depleted environments. Because a lactating female must both nurse and gather food, she must budget her time more efficiently than a virgin animal to balance both demands (Cruz et al., 2010).

Morphine treatment during late pregnancy increases serum progesterone levels, without affecting corticosterone, estradiol, and prolactin levels, demonstrating a progesterone response to opioidergic stimulation (Sukikara et al., 2011). Serum estradiol and progesterone levels can be affected by opioidergic stimulation (Fischer et al., 2009)

The present study was designed to test whether a moderate increase in plasma progesterone levels modulates the expression of behavior during lactation. We injected progesterone daily during late pregnancy. Progesterone-treated dams showed differences in both maternal behavior and behavioral selection, suggesting that this hormone modulates the behavioral repertoire during lactation, perhaps by interacting with the opioidergic system.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and housing

The subjects were adult Wistar nulliparous female rats that weighed 280-300 g and were 90 days of age at the beginning of the experiments. In all of the experiments, the females were time-mated by placing them with sexually experienced males. The day when sperm was detected in vaginal cytology was designated day 1 of pregnancy. Pregnant females were individually housed in opaque polypropylene cages (41 × 34 × 16 cm) that contained medium-grade pine flakes. Food and water were available *ad libitum* during all of the experiments. The test rooms had controlled light (6:00 AM-6:00 PM) and temperature (23-25°C). After giving birth, on lactation day 2, the pups were culled to four males and four females (eight total pups per dam).

2.2. Pretreatment

The rats were subcutaneously injected with peanut oil (vehicle) or progesterone (400 and 500 µg; Sigma Aldrich) in vehicle, daily in the morning (8:00 AM-9:00 AM) for 5 days, beginning on pregnancy day 17. The total volume injected into each animal was 0.3 ml/day.

Parturition was considered day 0 of lactation. On postpartum days 3 and 4, the dams were placed into the experimental cage for 30 min for adaptation without their pups. The size of the experimental cage was identical to the homecage but without wood pine flakes and made of Plexiglas to permit the animal behavior to be videotaped. The animals were maintained in accordance with the guidelines of the Committee on Animals of the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), similar to the Committee on the Care and Use of Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA. In all of the experiments, the animals were tested once.

2.3. *Drugs*

According to the experimental design, the dams were pretreated with peanut oil or progesterone (4-pregnene-3,20-dione; Sigma Aldrich) 400 and 500 µg and challenged with 0.9% saline or morphine sulfate (Cristália Laboratory, São Paulo, Brazil) 1.5 mg/Kg. All of the injections were subcutaneous in a volume of 1 ml/kg body weight.

2.4. *Behavioral observations*

On the morning of postpartum day 5 or 6, the dams were tested only for maternal care (Experiment 2) or simultaneously for maternal and predatory behavior (Experiment 3). The dams were placed into the experimental cage and 30 min later received an acute injection of saline or 1.5 mg/kg morphine according to the experimental design. Thirty minutes later, eight pups were introduced into the cage for the behavioral test (Experiment 2), or eight pups with five live mature cockroaches (*Picnocellus surinamensis*) around 2 cm each one, were introduced into the cage for the behavioral selection test (Experiment 3). During the 30 min trial, the dams were observed for maternal and insect-hunting behavior. The following parameters were recorded for maternal care: percentage of dams that expressed different aspects of maternal behavior, such as retrieval of the first, fifth, and eighth pups, kyphosis, and full maternal behavior. Full maternal behavior was characterized when a dam, after retrieving and grouping at least five pups, arched over the pups with her legs splayed, and the pups attached to her nipples, and the dam remained in this position for at least three consecutive minutes. The time spent engaging in general activity, foraging, self-grooming, and standing still was also recorded. These behaviors were considered non-

maternal behaviors, the time engaged in which was compared with the time spent taking care of the pups. In Experiment 1, we analyzed the percentage of animals that showed parturition during the normal period of delivery and the percentage of dams that did not give birth after the pretreatment. Experiment 2 also evaluated predatory hunting behavior, reflected by the percentage of dams that captured the first and fifth insects. Videotaped behavior was analyzed using Etholog 2.2 software (Ottoni, 2000). Each animal was tested once.

2.5. Experiment 1: Lack of influence of progesterone treatment on parturition

The rats were injected subcutaneously with peanut oil or 400 and 500 µg progesterone daily in the morning (8:00 AM-9:00 AM) for 5 days, beginning on pregnancy day 17. The percentage of animals that showed parturition during the expected period of delivery and the percentage of dams that did not give birth after the treatment were compared.

2.6. Experiment 2: Effects of progesterone pretreatment on maternal behavior after opioidergic stimulation

The rats were injected subcutaneously with peanut oil or 400 µg progesterone daily in the morning (8:00 AM-9:00 AM) for 5 days, beginning on pregnancy day 17. Parturition was considered day 0 of lactation. On postpartum days 3 and 4, the dams were individually placed into the experimental cage for 30 min for adaptation without their pups. On the morning of postpartum day 5 or 6, the dams were tested for maternal behavior. The dams were placed into the experimental cage and 30 min later received an acute injection of saline or 1.5 mg/kg morphine according to the experimental design.

Thirty minutes later, eight pups were introduced for the maternal behavior test. During the 30 min trial, the dams were observed, and maternal behavior was recorded as described above.

2.7. Experiment 3: Effects of progesterone pretreatment on behavioral selection after opioidergic stimulation

The rats were injected subcutaneously with peanut oil or 400 µg progesterone daily in the morning (8:00 AM-9:00 AM) for 5 days, beginning on pregnancy day 17. Parturition was considered day 0 of lactation. On postpartum days 3 and 4, the dams were placed into the experimental cage for 30 min for adaptation without their pups. On the morning of postpartum day 5 or 6, the dams were tested for maternal and predatory behavior. The dams were placed into the experimental cage and 30 min later received an acute injection of saline or 1.5 mg/kg morphine according to the experimental design. Thirty minutes later, eight pups were introduced with five live mature cockroaches for the behavioral selection test. During the 30 min trial, the dams were observed for maternal and insect-hunting behavior.

2.8. Statistical analysis

Fisher's Exact Probability Test was used to compare the number of animals in parturition during the expected period of the 21st to 22nd day of pregnancy, retrieval of first, fifth, and eighth pups, kyphosis, full maternal behavior, and hunting the first and fifth cockroaches. Comparisons between the time spent engaging in maternal and non-maternal behavior among groups were analyzed by two-way parametric analysis of variance (ANOVA), with pharmacological challenge (saline or 1.5 mg/kg morphine) as

one factor and type of behavior (maternal vs. non-maternal) as the other factor, followed by Bonferroni's *post hoc* test. A probability of $p < 0.05$ was considered significant for all comparisons.

3. Results

3.1. Experiment 1: Lack of influence of progesterone treatment on parturition

The percentage of animals that gave birth after 500 µg progesterone pretreatment during pregnancy was lower compared with the control group (Fisher's Exact Probability Test, one-tailed, $p = 0.0163$; Table 1) and the 400 µg progesterone group (Fisher's Exact Probability Test, one-tailed, $p = 0.0325$; Table 1). The percentage of dams that gave birth during the expected gestational period (21st-22nd day of pregnancy) was much lower in the 500 µg progesterone pretreatment group compared with the other groups (Fisher's Exact Probability Test, one-tailed, $p < 0.0001$; Table 1). Fifty percent of the dams in the 500 µg progesterone pretreatment group that delivered the pups gave birth after the 22nd day of pregnancy, and the other 50% of this group did not give birth and had parturition problems, such as dystosia (Table 1). Thus, the 400 µg/day dose was used in the following experiments.

3.2. Experiment 2: Effects of progesterone pretreatment on maternal behavior after opioidergic stimulation

The percentage of dams that retrieved the first pup was lower in the OM and PM groups compared with the control (OS) group (Fisher's Exact Probability Test, OS × PM, $p = 0.0108$; OS × OM, $p = 0.0198$; Fig. 1A). The same occurred when retrieval of

the fifth pup was analyzed (Fisher's Exact Probability Test, OS $\times$ OM, $p = 0.0198$; OS $\times$ PM, $p = 0.0198$; Fig. 1B). The percentage of dams that retrieved the eighth pup was lower in the PM group compared with control (OS) group (Fisher's Exact Probability Test, OS $\times$ PM, $p = 0.0325$; Fig. 1C). Kyphosis not occurred only in the PM group compared with the OS and PS groups (Fisher's Exact Probability Test, OS $\times$ PM, $p = 0.05$; PS $\times$ PM, $p = 0.05$; Fig. 1D). The percentage of dams that displayed full maternal behavior was lower only in the PM group compared with the OS and PS groups (Fisher's Exact Probability Test, OS $\times$ PM, $p = 0.0108$; PS $\times$ PM, $p = 0.0325$; Fig. 1E). With regard to the time spent engaging in maternal and non-maternal behavior, two-way ANOVA revealed a significant effect of behavior ($F_{1,54} = 74.47$, $p < 0.0001$; Fig. 1F). The OM and PM groups spent more time engaging in non-maternal behavior.

3.3. Experiment 3: Effects of progesterone pretreatment on behavioral selection after opioidergic stimulation

The percentage of dams that retrieved the first pup was lower in the OM and PM groups compared with the control (OS) group (Fisher's Exact Probability Test, OS $\times$ PM, $p = 0.0198$; OS $\times$ OM, $p = 0.05$; Fig. 2A). The percentage of dams that retrieved the fifth pup was lower only in the PM group compared with the control (OS) group (Fisher's Exact Probability Test, OS $\times$ PM, $p = 0.0198$; Fig. 2B). The percentage of dams that retrieved the eighth pup was lower in both the OM and PM groups compared with the control (OS) group and PS group (Fisher's Exact Probability Test, OS $\times$ OM, $p = 0.0198$; OS $\times$ PM, $p = 0.0031$; PS $\times$ PM, $p = 0.0325$; Fig. 2C). Kyphosis occurred only in the PM group compared with the OS group (Fisher's Exact Probability Test, OS

× PM, $p = 0.05$; Fig. 2D). The percentage of dams that displayed full maternal behavior was lower in the OM and PM groups compared with the OS and OM groups (Fisher's Exact Probability Test, OS × OM, $p = 0.0031$; OS × PM, $p = 0.0031$; Fig. 2E). With regard to the time spent engaging in maternal and non-maternal behavior, two-way ANOVA revealed a significant effect of behavior ($F_{1,54} = 63.34$, $p < 0.0001$; Fig. 2F). The PS, OM, and PM groups spent more time engaging in non-maternal behavior.

With regard to the percentage of dams that hunted the first insect, both the OM and PM groups captured the first insect more compared with the OS and PS groups (Fisher's Exact Probability Test, OS × OM, $p = 0.0198$; OS × PM, $p = 0.0031$; PS × PM, $p = 0.010$; Fig. 3A). No other differences were found in hunting the fifth insect among groups (Fig. 3B).

Discussion

A recent study from this laboratory showed that, during late pregnancy, progesterone levels increase in response to opioidergic stimulation (Sukikara et al., 2011). The present study tested the possible involvement of this hormone in opioid-mediated behavioral changes during early lactation. Progesterone has inhibitory actions on maternal behavior, and the decrease in serum progesterone levels before parturition is an important factor that determines the onset of maternal care (Brunton and Russell, 2010; Mann and Gervais, 2011). Experiment 1 was designed to verify that the progesterone treatment used in this study did not affect either the percentage of animals that delivered pups or the duration of the pregnancy period. Thus, the behavioral data obtained from the animals that were treated with progesterone in the subsequent experiments (Experiments 2 and 3) can be interpreted as being a consequence of the

progesterone treatment during late pregnancy. Because behaviorally meaningful morphine pretreatment induces a unique increase in serum progesterone levels, this study was designed to test whether such an increase in progesterone levels induces behavioral changes during lactation. Pregnant rats received daily injections of 400 µg progesterone from day 17 to 22 of pregnancy, and we tested the animals for maternal behavior during lactation. To determine whether progesterone pretreatment interferes with behavioral selection during lactation, a third experiment was conducted with progesterone pretreated animals that were tested simultaneously for hunting and maternal behavior.

In Experiment 2, the dams pretreated with progesterone were tested only for maternal behavior. A morphine challenge was used to determine whether pretreatment modifies the sensitivity to the inhibitory effects of this opioid on maternal behavior. The dams pretreated with progesterone showed behavioral differences from control animals only when challenged with morphine. Specifically, decreases in retrieving the eighth pup, kyphosis, and full maternal behavior were observed in the dams that were pretreated with progesterone and challenged with morphine (PM group) compared with the OS group. The maternal inhibition expressed in the PM group may be attributable to the progesterone-induced increase in opioid sensitivity to inhibition of maternal behavior. Both the PM and OM groups had a lower percentage of animals that retrieved the first pup. Both the PM and OM groups also spent more time displaying non-maternal behavior than maternal behavior compared with the control (OS) group. This suggests that these parameters may not be as sensitive to progesterone pretreatment when the dams are tested only with their pups. Alternatively, this may also have been

attributable to a greater sensitivity of these parameters to opioid stimulation, making the possible effect of progesterone pretreatment more difficult to be revealed.

Experiment 3 was designed to test whether the increase in prepartum progesterone levels interferes with behavioral selection and whether such progesterone pretreatment has consequences on behavioral selection (maternal *vs.* hunting behavior). Consistent with the previous experiment, kyphosis was inhibited only in the PM group, whereas the percentage of animals that retrieved the first pup decreased in both the OM and PM groups. This suggests that the effects of progesterone pretreatment and opioid stimulation on these parameters are analogous in both paradigms (*i.e.*, with or without insects). In contrast to Experiment 2, the percentage of animals that retrieved the eighth pup and displayed full maternal behavior decreased in both the OM and PM groups. This suggests that the experimental maternal *vs.* hunting paradigm for behavioral selection is sensitive to opioidergic manipulation. Consistent with Experiment 2, the OM and PM groups both spent significantly more time engaging in non-maternal behavior compared with the time spent engaging in maternal behavior. The PS group spent a longer time engaging in non-maternal behavior, which may have been attributable to the progesterone-induced increase in the sensitivity to endogenous opioids. Alternatively, changes in serum progesterone levels during late pregnancy may modulate the mechanisms that influence behavioral selection during lactation. With regard to hunting behavior, the OM and PM groups displayed a similar profile. Morphine treatment stimulated hunting in both groups. This is consistent with previous studies (Sukikara et al., 2007; Cruz et al., 2010). According to Mann and Gervais, 2011, environmental enrichment can have a negative impact on the expression of maternal behavior. In this study, environmental enrichment in the presence of the insect was able

to affect important parameters of maternal behavior.

The present results showed that prenatal progesterone treatment affected postpartum behavior. The present study suggests that prepartum progesterone treatment can change opioid sensitivity to its effects on maternal behavior and behavioral selection during lactation.

References

- Antonijevic, I.A., Russell, J.A., Bicknell, R.J., Leng, G., Douglas, A.J., 2000. Effect of progesterone on the activation of neurones of the supraoptic nucleus during parturition. *J. Reprod. Fertil.* 120, 367-376.
- Barr, C.S., Schwandt, M.L., Lindell, S.G., Higley, J.D., Maestripieri, D., Goldman, D., Suomi, S.J., Heilig, M., 2008. Variation at the mu-opioid receptor gene (*OPRM1*) influences attachment behavior in infant primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105, 5277-5281.
- Bridges, R.S., Grimm, C.T., 1982. Reversal of morphine disruption of maternal behavior by concurrent treatment with the opiate antagonist naloxone. *Science* 218, 166-168.
- Bridges, R.S., 1984. A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence, and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat. *Endocrinology* 114, 930-940.
- Brunton, P.J., Russell, J.A., 2010. Endocrine induced changes in brain function during pregnancy. *Brain. Res.* 1364, 198-215.

- Comoli, E., Ribeiro-Barbosa, E.R., Canteras, N.S., 2003. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. *Behav. Brain Res.* 138, 17-28.
- Comoli, E., Ribeiro-Barbosa, E.R., Negrão, N., Goto, M., Canteras, N.S., 2005. Functional mapping of the prosencephalic systems involved in organizing predatory behavior in rats. *Neuroscience* 130, 1055-1067.
- Cruz, A.M., Maiorka, P.C., Canteras, N.S., Sukikara, M.H., Felicio, L.F., 2010. Morphine treatment during pregnancy modulates behavioral selection in lactating rats. *Physiol. Behav.* 101, 40-44.
- Fischer, L., Arthuri, M.T., Torres-Chávez, K.E., Tambeli, C.H., 2009. Contribution of endogenous opioids to gonadal hormones-induced temporomandibular joint antinociception. *Behav. Neurosci.* 123, 1129-1140.
- Johnson, N.L., Carini, L., Schenk, M.E., Stewart, M., Byrnes, E.M., 2011. Adolescent opiate exposure in the female rat induces subtle alterations in maternal care and transgenerational effects on play behavior. *Front. Psychiatry.* 2, 29.
- Mann, P.E., 2006. Finasteride delays the onset of maternal behavior in primigravid rats. *Physiol. Behav.* 88, 333-338.
- Mann, P.E., Gervais, K.J., 2011. Environmental enrichment delays pup-induced maternal behavior in rats. *Develop. Psychobiol.* 53, 371-382.
- Miranda-Paiva, C.M., Nasello, A.G., Yin, A.J., Felicio, L.F., 2001. Morphine pretreatment increases opioid inhibitory effects on maternal behavior. *Brain Res. Bull.* 55, 501-505.

- Miranda-Paiva, C.M., Ribeiro-Barbosa, E.R., Canteras, N.S., Felicio, L.F., 2003. A role for the periaqueductal grey in opioidergic inhibition of maternal behavior. *Eur. J. Neurosci.* 18, 667-674.
- Miranda-Paiva, C.M., Canteras, N.S., Sukikara, M.H., Nasello, A.G., Mackowiak, I.I., Felicio, L.F., 2007. Periaqueductal gray cholecystokinin infusions block morphine-induced disruption of maternal behavior. *Peptides* 28, 657-662.
- Numan, M., 1994. Maternal behavior. In: Knobil E, Neill JD (Editors), *The physiology of reproduction*, 2nd edn. New York: Raven Press, 221-302.
- Numan, M., 2007. Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. *Dev. Psychobiol.* 49, 12-21.
- Ottoni, E.B., 2000. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav. Res. Methods Instrum. Comput.* 32, 446-449.
- Schino, G., Troisi, A., 2009. Opiate receptor blockade in juvenile macaques: effect on affiliative interactions with their mothers and group companions. *Brain Res.* 576, 125-130.
- Sukikara, M.H., Mota-Ortiz, S.R., Baldo, M.V., Felicio, L.F., Canteras, N.S., 2006. A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. *J. Neurosci.* 26, 2583-2589.
- Sukikara, M.H., Platero, M.D., Canteras, N.S., Felicio, L.F., 2007. Opiate regulation of behavioral selection during lactation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 87, 315-320.
- Sukikara, M.H., Cruz, A.M., Felipe, E.C., Anselmo-Franci, J.A., Canteras, N.S., de Oliveira, C.A., Felicio, L.F., 2011. Morphine-induced changes in opioid sensitivity in postpartum females: a unique progesterone response. *J. Neuroendocrinol.* 23, 1134-1138.

Weller, A., Feldman, R., 2003. Emotion regulation and touch in infants: the role of cholecystokinin and opioids. *Peptides* 24, 779-788.

Table 1: Influence of progesterone treatment on parturition. Fisher's Exact Probability Test, * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$

Pretreatment dose ($\mu\text{g/day}$)	Number of animals	% of dams showing parturition	Parturition on expected period 21 st – 22 nd day of pregnancy
0	10	100	100
400	10	100	100
500	10	50 *	0 ***

Fig. 1. Effects of morphine challenge (1.5 mg/kg) on maternal behavior responses after progesterone pretreatment (400 micrograms/dam/day) during pregnancy. (A) percentage of lactating rats that retrieved the 1st pup (B) percentage of lactating rats that retrieved the 8th pup, (C) percentage of dams showing kyphosis, (D) percentage of dams showing full maternal behavior. Fisher's Exact Probability Test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. (E) Time spent in maternal *versus* non-maternal behaviors during full time test. Data are expressed as mean $\pm$ standard error (two-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

Fig. 2. Effects of morphine challenge (1.5 mg/kg) on behavioral selection after progesterone pretreatment (400 micrograms/dam/day) during pregnancy. (A) percentage of lactating rats that retrieved the 1st pup, (B) percentage of lactating rats that retrieved the 8th pup, (C) percentage of dams showing kyphosis, (D) percentage of dams showing full maternal behavior. Fisher's Exact Probability Test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. (E) Time spent in maternal *versus* non-maternal behaviors during full time test. Data are expressed as mean $\pm$ standard error (two-way ANOVA followed by Bonferroni's test),

Fig. 3. Effects of morphine challenge (1.5 mg/kg) on hunting insects after progesterone pretreatment (400 micrograms/dam/day) during pregnancy. (A) percentage of lactating rats that captured the 1st insect, (B) percentage of lactating rats that captured all five insects.
Fisher's Exact Probability Test, * $p < 0.05$.

MICHIGAN STATE UNIVERSITY

April 2, 2013

To whom it may concern:

I am writing to provide my thoughts about the performance of Aline de Mello Cruz, who was a member of my laboratory in the Psychology Department and Neuroscience Program at Michigan State University (East Lansing, Michigan, USA) for the past 8 months.

Aline was involved in two experiments studying the neuropeptide control of maternal behavior and anxiety in postpartum laboratory rats. The first was a behavioral pharmacology experiment examining the effects of brain infusion of the neuropeptide, CGRP, on maternal behavior and anxiety. This experiment provided Aline expertise in stereotaxic surgery, intracranial cannulation, drug infusion, and two types of behavior testing she was unfamiliar with. The second experiment she worked on involved neuroanatomical tracing of CGRP projections from the midbrain to the forebrain. This involved stereotaxic surgery, iontophoresis of the tracer into the brain, immunohistochemistry, general histology, and microscope analysis of the brains. Aline's performance was great on these projects – most salient is that she is one of the best small rodent surgeons I have seen. Her cannulation placement accuracy rate was almost 100%. Her animal behavior observation skills are also very good. Aline's data revealed that the behavioral effects of CGRP were rather small (a very small decrease in maternal nursing and no effect on anxiety), which is disappointing, but of course not her fault. Because of some recent breeding problems in our animal colony that resulted in a smaller number of postpartum females for Aline to work with, the neuroanatomical experiment will continue even after she departs my lab (a technician will continue it). We do already know that at least 4 of the 15 animals Aline performed iontophoresis on will be useable, which is about half of the total we are hoping to have at the end. Depending on the outcome of this anatomical study, I believe we could combine the two experiments to produce a publishable manuscript, and Aline is very interested and motivated to do so. She and I have agreed to continue communicating this summer about that possibility. I will also see Aline at a conference this summer where we can discuss it in person.

NEUROSCIENCE PROGRAM

Michigan State University
108 Giltner Hall
East Lansing, MI
48824-1101

Phone: 517/353-8947
517/432-1117
Fax: 517/432-2744

<http://www.ns.msu.edu/neurosci>

I believe Aline has received valuable training in skills that will enhance her career as a neuroscientist. I was delighted to have her here. She quickly integrated into my laboratory and will be missed by the members of the lab.

Very sincerely,

Joseph S. Lonstein, Ph.D.
Associate Professor

APÊNDICE H

MICHIGAN STATE
UNIVERSITY

April 29, 2013

To Whom It May Concern:

Aline de Mello Cruz attended and participated in the lecture portion of my course, NSC837 Confocal Microscopy, during the Fall 2012 semester (August 3 - November 26, 2012). This 3-credit, 12-lecture, graduate-level course covered a range of microscopy topics including confocal imaging, microscope optics, light sources, lasers, transmitted light imaging, fluorescence imaging, reflection imaging, sample preparation and advanced imaging techniques, including Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), Förster resonance energy transfer (FRET), spectral imaging, laser capture, two-photon microscopy and super resolution microscopy.

Sincerely,

CENTER FOR
ADVANCED
MICROSCOPY

Michigan State University
B-4 Center for Integrated Plant Systems
East Lansing, MI
48824-1311
517/353-8798
e-mail: fiegler@pilot.msu.edu
web: <http://cam.msu.edu>
Business Office
517/432-1885
Fax: 517/432-5174

Melinda Frame, PhD
Confocal Microscopy Supervisor
Michigan State University
Center for Advanced Microscopy
578 Wilson Road, CIPS Building, Room B7
East Lansing, MI 48824

NOTAS