MARIANNE ORLANDINI KLEIN

**Papel dos receptores opióides μ e κ da substância
cinzenta periaquedutal (PAG) na seleção
comportamental durante a lactação**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2012

MARIANNE ORLANDINI KLEIN

**Papel dos receptores opióides μ e κ da substância cinzenta
periaquedutal (PAG) na seleção comportamental durante a lactação**

Dissertação apresentada ao Departamento
de Farmacologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Luciano Freitas Felicio

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Klein, Marianne Orlandini.

Papel dos receptores opóides μ e κ da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na seleção comportamental durante a lactação / Marianne Orlandini Klein. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Freitas Felício.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Comportamento materno.

Versão do título para o inglês: Role of periaqueductal gray μ and κ opioid receptors in behavioral selection during lactation.

1. Comportamento materno animal 2. Comportamento predatório animal 3. Substância cinzenta periaquedutal I. Felício, Prof. Dr. Luciano Freitas II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB037/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marianne Orlandini Klein.

Título da Dissertação: Papel dos receptores opóides μ e κ da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na seleção comportamental durante a lactação.

Orientador(a): Prof. Dr. Luciano Freitas Felicio.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **068** nas fls. **88** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Luciano Freitas Felício, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Papel dos receptores opioidérgicos na seleção de comportamentos durante a lactação** do qual participam o(s) alunos **Marianne Orlandini Klein, Aline de Mello Cruz**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **30.07.2010**, com **validade de 3 anos**.

São Paulo, 03 de agosto de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Papel dos receptores opioidérgicos na seleção de comportamentos durante a lactação", protocolado sob o nº 1960/2010, 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 Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 11/08/2010.

We certify that the Research "The role of opioid receptors in behavioral selection during lactation", protocol number 1960/2010, utilizing 120 (hundred twenty) 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 08/11/2010.

São Paulo, 12 de agosto de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

A eles, sempre a eles, os melhores pais do
mundo, Luiz Alberto e Sandra, que são a
razão de eu estar aqui hoje.
Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meu caminho e me dar saúde e perseverança para segui-lo.

A meus pais, Luiz Alberto e Sandra, por todo carinho, amor, parceria, incentivo, apoio financeiro, enfim, eu poderia escrever páginas e páginas dizendo o quanto vocês são importantes e fundamentais em minha vida, mas mesmo assim acredito que isso ainda não seria suficiente para expressar toda a gratidão e amor que eu sinto por vocês. Sou muito abençoada por ter a família que tenho e agradeço a Deus todos os dias por isso. Muito obrigada.

A meus irmãos, Vitor e Gabriel, por fazerem parte da minha vida e de nossa abençoada família. Encherem meus dias de orgulho e alegria e compreenderem minha ausência.

A meu namorado, Marcos Vinicius, por estar comigo novamente em mais uma etapa de minha vida. Sofrendo, vibrando e torcendo junto comigo. Por me suportar, o que muitas vezes não é uma tarefa fácil, e compreender e apoiar minhas escolhas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Freitas Felicio, por todo apoio e dedicação. Por sempre estar pronto a me auxiliar, por ter me recebido de braços abertos em São Paulo e por ter acreditado em mim.

À amiga e companheira, Aline, que me ensinou tudo o que sabia sem medir esforços para que meus experimentos também dessem certo. Pela amizade e carinho dispensados a mim, pela grande acolhida aqui em São Paulo, em abrir as portas de sua casa a uma desconhecida e acreditar em meu potencial. Muito obrigada.

Às amigas, Evelyn e Franciele, por terem se identificado comigo e tornado os momentos da Pós-graduação e minha estadia em São Paulo mais alegre e divertida. Por estarem sempre prontas a conversar e me mostrar um ponto de vista diferente sobre os assuntos de nosso interesse.

Aos amigos de laboratório, Renato, Renata, e a técnica Magali, pelos momentos de descontração entre um experimento e outro e pela paciência com meu temperamento.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de auxílio financeiro, sem a qual não seria possível permanecer em São Paulo (Processo 2010/06774-0).

A todas as pessoas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo por toda a ajuda e acolhimento.

A todos que de alguma maneira foram importantes e fundamentais para a execução desse trabalho.

“... como aliviar a dor do que não foi
vivido? Se iludindo menos e vivendo mais!

A cada dia que vivo, mais me convenço
de que o desperdício da vida
está no amor que não damos, nas forças
que não usamos, na prudência egoísta
que nada arrisca, e que, esquivando-se
do sofrimento, perdemos também a
felicidade. A dor é inevitável.
O sofrimento é opcional...”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Klein MO. Papel dos receptores opióides μ e κ da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na seleção comportamental durante a lactação. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2012.

Após o parto, a mãe deve distribuir seu tempo entre a busca por comida e o cuidado com a prole. Mecanismos endógenos permitem à fêmea selecionar a expressão de comportamentos tais como alimentar os filhotes ou procurar alimento. Estudos recentes mostraram que a substância cinzenta periaquedutal (PAG) é uma área central importante de regulação e seleção sendo também um sítio de ação de opióides. No entanto, ainda não se conhece a importância funcional de cada um dos receptores opióides na PAG sobre a expressão dos comportamentos materno e predatório. Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho foi investigar a importância da função dos diferentes receptores opióides da PAG rostro-lateral (rPAGl) na seleção comportamental de ratas durante a lactação. Foram utilizadas ratas *Wistar* virgens adultas com cânula unilateral implantada na rPAGl e divididas aleatoriamente em dois experimentos: Experimento 1, onde foi testada a relevância funcional dos receptores opióides μ e κ por meio do uso de agonistas específicos, bem como da morfina, um agonista opióide não seletivo, preferencialmente μ , na seleção comportamental de ratas lactantes; Experimento 2, no qual foi testada a importância funcional dos receptores μ e κ frente à injeção de morfina, com o uso de antagonistas específicos. Os animais foram divididos entre grupos, que receberam injeções agudas na rPAGl de: Experimento 1, agonista μ (DAMGO, 10 nmol), ou do agonista κ (U69593, 10 nmol), ou de sulfato de morfina (7,91 nmol), ou veículo (solução salina 0,9%); Experimento 2, antagonista μ (CTAP, 10 nmol) seguido de sulfato de morfina (7,91 nmol), ou antagonista κ (nor-Binaltorphimine; 10 nmol) seguido de sulfato de morfina (7,91 nmol), ou sulfato de morfina, ou veículo. Em seguida, os animais foram submetidos ao teste de comportamento maternal *versus* predatório. Em geral, no Experimento 1, os dados indicam que o tratamento com morfina injetada na PAG inibiu o comportamento maternal sem alterar de maneira significativa o comportamento predatório. Por outro lado, os tratamentos com os agonistas μ e κ não foram capazes de modificar de maneira significativa nem o

comportamento maternal tampouco o de caçar insetos. No Experimento 2, a ação da morfina com bloqueio do receptor opióide μ inibiu os parâmetros de caça. O bloqueio de um dos receptores opióides frente à ação da morfina não foi capaz de reverter a inibição do comportamento maternal. Os resultados sugerem que o tônus opióide endógeno é importante para a expressão do comportamento predatório. Fica levantada a possibilidade de que a morfina age em mais de um tipo de receptor opióide simultaneamente para promover a inibição do comportamento materno nesse contexto.

Palavras-chave: Comportamento maternal. Comportamento predatório. Opióides. Substância cinzenta periaquedutal.

ABSTRACT

Klein MO. Role of periaqueductal gray μ and κ opioid receptors in behavioral selection during lactation. [Masters thesis]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2012.

After giving birth, a mother must both provide subsistence and care for her young. Endogenous mechanisms allow dams to select their behavioral expressions, such as feeding the pups or searching for food. Recent studies showed that the periaqueductal gray (PAG) is an important area for behavioral selection. The PAG is also a site of opioid action. However, the functional role of PAG opioid receptors in this context is not clear. The main goal of this study was to investigate the functional importance of two opioid receptors in the rostro-lateral PAG (rPAGl) in behavioral selection in rats during lactation. Adult virgin female Wistar rats with unilateral guide cannulae implanted in the rPAGl were randomly separated into two experiments. Experiment 1 tested the functional relevance of μ and κ opioid receptors using specific receptor agonists and morphine, a nonselective opioid agonist, and assessing their effect on behavioral selection in lactating rats. Experiment 2 tested the functional importance of μ and κ opioid receptors in the presence of morphine using specific receptor antagonists. The animals were divided into groups that received acute injections of the following in the rPAGl: Experiment 1, μ receptor agonist DAMGO (10 nmol), κ receptor agonist U69593 (10 nmol), morphine sulfate (7.91 nmol), and vehicle (saline); Experiment 2, μ receptor antagonist CTAP (10 nmol) followed by morphine sulfate (7.91 nmol), κ receptor antagonist nor-binaltorphimine (10 nmol) before morphine sulfate (7.91 nmol), morphine sulfate, and vehicle. The animals were then tested for maternal behavior vs. predatory hunting. In Experiment 1, morphine injection into the PAG inhibited maternal behavior without significantly changing predatory behavior. The μ and κ agonist treatments did not modify either maternal behavior or predatory hunting. In Experiment 2, morphine inhibited hunting parameters by blocking μ opioid receptors. The blockade of a single opioid receptor in the presence of morphine did not reverse the morphine-induced inhibition of maternal behavior. The results suggest that endogenous opioid tone is important for the expression of predatory behavior. The results further raise the

possibility that morphine acts at more than one type of opioid receptor simultaneously to inhibit maternal behavior in this context.

Keywords: Maternal behavior. Predatory behavior. Opioids. Periaqueductal gray.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação das subdivisões da PAG rostral.....	27
Figura 2 – Aparato experimental utilizado para realização e filmagem dos testes comportamentais.....	33
Quadro 1 – Concentrações das drogas utilizadas (em nmol e µg) para cada grupo experimental.....	35
Figura 3 – Representação esquemática do delineamento experimental.....	36
Quadro 2 – Parâmetros comportamentais analisados durante o teste comportamental.....	38
Figura 4 – Fêmea com cânula guia implantada em cifose fisiológica.....	39
Figura 5 – Representação esquemática da disposição das linhas perpendiculares (pretas) que o animal cruza na caixa experimental.....	39
Quadro 3 – Escala de escores em relação ao tempo de teste.....	40
Figura 6 – Fotomicrografia de cânula implantada na rPAGI.....	42
Figura 7 – Local das injeções na rPAGI dos grupos CS e MOR.....	43
Figura 8 – Local das injeções da rPAGI dos grupos µ e κ.....	43
Figura 9 – Locas das injeções na rPAGI dos grupos NµM e NκM.....	44
Figura 10 – Número médio de baratas capturadas por cada grupo experimental em 1800s de teste.....	45
Figura 11 – Latência para captura das baratas do Experimento 1.....	46
Figura 12 – Percentual de captura dos insetos do Experimento 1.....	47
Figura 13 – Parâmetros do comportamento de caça predatória entre os grupos do Experimento 1.....	48
Figura 14 – Latência para busca dos filhotes do Experimento 1.....	50
Figura 15 – Percentual de mães que buscaram os filhotes no Experimento 1.....	51
Figura 16 – Parâmetros de cuidados com os filhotes no Experimento 1.....	52
Figura 17 – Percentual de lactantes que realizaram cifose (-), cifose (+) e comportamento materno total no Experimento 1.....	53
Figura 18 – Número médio de baratas capturadas por cada grupo no Experimento 2.....	55
Figura 19 - Latência para captura das baratas no Experimento 2.....	57

Figura 20 – Correlação entre a latência para a captura de cada inseto e o tempo em que o animal permaneceu parado entre os grupos que receberam injeções locais de morfina no Experimento 2.....	58
Figura 21 – Percentual de animais que capturaram as baratas no Experimento 2...	59
Figura 22 – Parâmetros do comportamento de caça predatória no Experimento 2...	60
Figura 23 – Escores de latência para busca aos filhotes no Experimento 2.....	61
Figura 24 – Percentual de animais que buscaram o primeiro, quinto e oitavo filhotes no Experimento 2.....	62
Figura 25 – Tempo em que as mães permaneceram lambendo seus filhotes, agrupando-os, número de contatos com os filhotes, e número de buscas aos filhotes realizadas pelas fêmeas no Experimento 2.....	63
Figura 26 – Percentual de animais que realizaram cifo (-), cifo (+) e comportamento materno total no Experimento 2.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de tempo que a fêmea explorou o ambiente, número de linhas cruzadas, tempo em que os animais permaneceram parados e realizando auto-limpeza do Experimento 1.....	49
Tabela 2 – Número de baratas capturadas e filhotes buscados nos 15 minutos iniciais (900 s) e no tempo total de teste (1800 s) do Experimento 1.....	54
Tabela 3 – Parâmetros de tempo que o animal gastou explorando o ambiente, número de linhas cruzadas, tempo em que os animais permaneceram parados e realizando auto-limpeza no Experimento 2.....	55
Tabela 4 – Número de baratas capturadas e filhotes buscados nos 15 minutos iniciais (900 s) e no tempo total do teste do Experimento 2.....	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1.1 <i>Comportamento materno.....</i>	<i>20</i>
1.2 <i>Comportamento predatório.....</i>	<i>22</i>
1.3 <i>Opióides.....</i>	<i>23</i>
1.4 <i>Substância cinzenta periaquedutal.....</i>	<i>26</i>
2 OBJETIVOS.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 <i>Animais.....</i>	<i>31</i>
3.2 <i>Acasalamento e padronização da ninhada.....</i>	<i>31</i>
3.3 <i>Cirurgia estereotáxica para implantação de cânula guia.....</i>	<i>32</i>
3.4 <i>Habituação e manipulação dos animais.....</i>	<i>32</i>
3.5 <i>Teste comportamental.....</i>	<i>33</i>
3.6 <i>Drogas e doses utilizadas.....</i>	<i>34</i>
3.7 <i>Delineamento experimental.....</i>	<i>35</i>
3.8 <i>Perfusão transcárdica.....</i>	<i>36</i>
3.9 <i>Análises comportamentais.....</i>	<i>37</i>
3.10 <i>Análise estatística.....</i>	<i>40</i>
4 RESULTADOS.....	42
5 DISCUSSÃO.....	67
6 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	76

**“A resposta certa não importa
nada: o essencial é que as
perguntas estejam certas.”
Mário Quintana**

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Após o parto, toda mãe tem que manter um balanço entre a sua sobrevivência e a de sua prole. Assim, é necessário haver um equilíbrio entre a subsistência e a reprodução (Blaffer-hrdy, 1999; Felicio e Canteras, 2008). Devido a esse fato, ela deve dividir seu tempo mais eficientemente que um animal virgem para suprir eficientemente ambas as demandas (Cruz et al., 2010). Sendo assim, a sobrevivência e perpetuação da espécie dependem de estratégias bem sucedidas para a seleção do comportamento mais adaptativo (Felicio e Canteras, 2008).

Nesse sentido, pode ocorrer a inibição de um determinado comportamento favorecendo a expressão de outro com maior valor adaptativo (Teodorov et al., 2010). Para os mamíferos, a expressão ótima do repertório comportamental após o parto demanda uma grande adaptabilidade e versatilidade para que as espécies possam se perpetuar. Durante o período pós-parto, as fêmeas gastam grandes quantidades de energia cuidando de seus filhotes, enquanto que a disponibilidade de suprimentos para si própria pode variar (Felicio e Canteras, 2008; Sukikara et al., 2007). A sobrevivência dos neonatos recai sobre a mãe e sua habilidade de prover comida, calor, abrigo e proteção. Nos mamíferos placentários, a sincronização do comportamento maternal com o parto e a lactação, garante que a mãe responda às necessidades específicas dos filhotes no tempo exato (Numan et al., 2006). Entre os comportamentos básicos nessa fase, estão os de caçar e cuidar da prole.

O cérebro, tanto de aves quanto de mamíferos, é equipado com mecanismos que permitem à mãe selecionar a expressão de comportamentos, tais como alimentar os filhotes ou buscar comida. Esses mecanismos são importantes para o sucesso da experiência reprodutiva, sendo que o tempo que será gasto forrageando ou cuidando dos filhotes depende das circunstâncias ambientais de escassez ou não de suprimentos. Sendo assim, no tempo apropriado, variações funcionais de vias endógenas permitirão um ajuste ótimo deste balanço (Felicio e Canteras, 2008; Hinde et al., 2010).

A substância cinzenta periaquedutal (PAG) é uma importante região do sistema nervoso central que está envolvida em vários mecanismos comportamentais e fisiológicos distintos. Entre outras funções, estudos têm mostrado que a PAG também possui um importante papel na seleção de comportamentos materno e predatório (Felicio e Canteras, 2008; Sukikara et al., 2006, 2010).

Sukikara et al. (2006) relataram que a PAG age como um centro selecionador de respostas comportamentais adaptativas, função desconhecida anteriormente, o

que condiz com sua posição de integrar diferentes áreas do encéfalo. Além disso, esta estrutura parece estar envolvida no controle de vários aspectos do comportamento materno em ratas.

A PAG também parece ser um dos sítios de ação de opióides. Tendo estes, efeito inibitório sobre a expressão do comportamento materno, uma vez que a injeção de naloxona, um antagonista opióide, nesta região bloqueia os efeitos inibitórios de injeções sistêmicas de morfina sobre o comportamento materno (Grimm e Bridges, 1983; Miranda-Paiva et al., 2003; Numan et al., 2006).

1.1 Comportamento materno

O comportamento materno se encaixa na categoria de comportamentos parentais, os quais são definidos por qualquer comportamento de um membro de uma espécie frente a um membro reprodutivamente imaturo para garantir que este sobreviverá até a maturidade (Teodorov et al., 2010). Tais comportamentos também são importantes para o desenvolvimento do neonato (Ronca et al., 1993).

A mudança que ocorre durante a prenhez, de um cérebro virgem para um cérebro materno, é complexa, e tem início por meio da interação dos hormônios gestacionais e determinados genes que podem ser super ou pouco expressos (Kinsley e Amory-Meyer, 2011). Além disso, o cérebro das mães também é moldado por suas experiências, o que de alguma maneira envolve a regulação epigenética dos comportamentos e sistemas neurais (Curley et al., 2011; Hao et al., 2011; Johnson et al., 2011; Kinsley e Amory-Meyer, 2011).

Por definição, o comportamento materno refere-se a comportamentos apresentados durante os dias imediatamente antes e após o parto que são preparatórios para a chegada dos filhotes ou que estão relacionados aos cuidados com a prole, como lamber, amamentar e carregar os filhotes e o aumento de agressividade materna. Normalmente, o comportamento maternal aparece durante o parto ou muito próximo a ele. Logo após, a fêmea exibe um grande interesse por sua prole (Numan et al., 2006). Entre outras modificações que ocorrem com a mãe, há a redução de medo, aumento do aprendizado e de memória, o que favorece que ela possa deixar o ninho em busca de alimento estando preparada para adversidades que possa encontrar no caminho e que possibilita um retorno mais

breve aos cuidados com a prole (Kinsley, 2008; Kinsley et al., 1999; Zimmerknopf et al., 2011).

Em roedores, uma vez que os filhotes tenham nascido, a mãe agrupa-os no ninho, lambe-os no corpo e na região anogenital, comportamento realizado majoritariamente com os filhotes machos, e os amamenta, assumindo uma posição característica sobre os filhotes (Ugarte et al., 2010).

Mecanismos sensórios, hormonais, neurais e genéticos estão envolvidos na expressão do comportamento materno (Teodorov et al., 2010). A eliminação cirúrgica dos sentidos da visão, olfato, ou sensibilidade tátil do focinho ou região perioral de ratas não impede a resposta do comportamento materno (Numan et al., 2006). Entretanto, embora o sistema olfatório não promova nenhum tipo de regulação do comportamento materno *per se*, ele parece ser determinante das mudanças cerebrais ocorridas para favorecimento da expressão do comportamento materno (Kinsley e Amory-Meyer, 2011).

Estudos recentes de neuroimagem têm indicado que muitas das regiões que contribuem para o comportamento materno em ratas são ativadas durante a ocorrência de comportamento materno em mães humanas (Numan et al., 2006). Ao comparar o volume de regiões cerebrais de mulheres nas primeiras semanas após o parto e 3 a 4 meses após o mesmo, Kim et al. (2010), encontraram aumento de volume principalmente no córtex pré-frontal, nos lobos parietais e áreas mesencefálicas, como o hipotálamo, substância nigra e amígdala, que são áreas relacionadas a motivação e comportamento materno.

O risco de desenvolver doenças psiquiátricas ou psicose é maior em mulheres durante o período pós-parto (Garvey et al., 1983). Miranda-Paiva et al. (2001) observaram que a administração repetida de morfina periféricamente em ratas durante o último terço da gestação sensibiliza o animal para os efeitos inibitórios de opióides na expressão do comportamento materno durante a lactação. Ratas expostas a injeções de morfina durante o período perinatal desenvolveram um nível de tolerância médio a droga, que afetou a sensibilidade dos receptores opióides (Sobor et al., 2011). O opióide endógeno β -endorfina injetado via intracerebroventricular (i.c.v.) em ratas inibe a expressão do comportamento materno (Mann et al., 1991), sugerindo que os níveis de opióides endógenos possam influenciar na melhor expressão deste comportamento. Nesse sentido, Byrnes et al. (2000) aplicaram injeções sistêmicas ou centrais, via i.c.v., de naloxona, um

antagonista opióide, em ratas no período pós-parto e observaram que as fêmeas gastavam mais tempo amamentando e aninhando os filhotes. Opióides endógenos são importantes na manutenção da prenhez, e a retirada durante e após o parto de mecanismos de inibição opióide centrais facilitam o parto e o comportamento materno (Brunton e Russel, 2008).

Miranda-Paiva et al. (2003) notaram que a região rostro-lateral da PAG está particularmente ativada sob a inibição opioidérgica do comportamento materno, podendo ser então uma região crítica na mediação desse efeito.

A maternidade e a prenhez em ratas induzem um enriquecimento do repertório comportamental predatório acompanhado de novas conexões neurais (Kinsley e Amory-Meyer, 2011). Sukikara et al. (2006) confrontaram o comportamento materno com o predatório de ratas lactantes, e notaram que a administração de morfina nas mães favorece a caça predatória, preterindo o cuidado maternal, e que a PAG rostro-lateral (rPAGl) parece ter importante papel nessa seleção, já que a injeção central de naloxona, na rPAGl é capaz de bloquear a inibição do comportamento materno causada pela injeção periférica de morfina (Miranda-Paiva et al., 2003).

1.2 Comportamento predatório

No contexto da seleção natural, a busca pela presa é um comportamento característico da espécie, essencial para a sobrevivência do indivíduo, assim como a reprodução para a sobrevivência.

Para uma fêmea no período pós-parto, a quantidade ideal de tempo a ser utilizado explorando o ambiente e caçando depende das circunstâncias estabelecidas pelo meio ambiente. Atingir o ótimo de tempo e energia gastos com a caça nessa fase é particularmente importante. Haja vista que a mãe precisa também cuidar de sua prole (Felicio e Canteras, 2008).

Considerando o papel da PAG na mediação de respostas motivacionais, Comoli et al. (2003) analisaram o padrão de expressão da proteína Fos, que é usado como um indicador da ativação neuronal, frente à situação de caça predatória, tendo insetos como presa, e observaram que a rPAGl, principalmente sua porção mais externa, está predominantemente ativada nesta situação.

Interessantemente, essa mesma região está ativada quando há inibição opioidérgica do comportamento materno em ratas lactantes (Miranda-Paiva et al., 2003). Sukikara et al. (2006) observaram ao confrontar o comportamento materno e predatório em ratas no período pós-parto, que a injeção periférica de morfina em animais com lesões bilaterais na rPAGI, não é capaz de inibir a expressão do comportamento materno, enquanto que animais intactos preferem a busca pelos insetos, mostrando a influência desta área da PAG na seleção comportamental. Além disso, injeções periféricas de naloxona, um antagonista opióide não seletivo, em ratas no período pós-parto induziu a uma diminuição no número de insetos capturados, mostrando um possível papel da transmissão opioidérgica endógena na regulação do comportamento predatório (Sukikara et al., 2007).

Mota-Ortiz et al. (2012) viram que a rPAGI é importante para exibição do comportamento de caça predatória em ratos, já que animais que apresentam lesões bilaterais na rPAGI não perseguem ou atacam a presa, mas não apresentam alterações na atividade locomotora nem na ingestão regular de comida.

A análise do comportamento predatório de ratos tendo insetos como presa parece ser ideal. A utilização de baratas nesse paradigma se mostrou valiosa já que elas são inofensivas e não parecem causar nenhum tipo de comportamento aversivo aos ratos, que pelo contrário, as consomem vorazmente. Ademais, diferentes circuitos neurais parecem mediar o comportamento de comer relacionado à caça e a ingestão regular de alimento (Comoli et al., 2005).

1.3 Opióides

Opióides são substâncias de origem endógena ou sintética, referindo-se de forma ampla a todos os compostos relacionados ao ópio. O termo *opium* deriva da palavra grega *opos*, que significa suco, pois o fármaco é retirado do suco da papoula (*Papaver somniferum*) (Gutstein e Akil, 2005).

A morfina, um dos derivados do ópio, foi isolada pela primeira vez por Sertürner em 1806, e tem seu nome derivado de Morfeu, Deus grego dos sonhos. Há uma grande quantidade de ligantes opioidérgicos endógenos, mais de uma dúzia, embora existam apenas três tipos principais de receptores, μ , κ e δ (Gutstein e Akil, 2005). Esses são receptores metabotrópicos, ligados à proteína G para inibição da adenil ciclase, e consequente diminuição da síntese de AMPc, um

segundo mensageiro. Na membrana plasmática, facilitam a abertura dos canais de potássio, provocando hiperpolarização, e inibem a abertura dos canais de cálcio, impedindo a liberação de transmissor. Tais efeitos não estão associados à diminuição da formação de AMPc (Rang et al., 2007).

A ativação de receptores opióides por ligantes endógenos e exógenos resulta em múltiplos efeitos como analgesia, depressão respiratória, euforia, liberação de hormônios, inibição do trato gastrointestinal e efeitos na ansiedade (Waldhoer et al., 2004). Acredita-se que os receptores μ sejam responsáveis pela maioria dos efeitos analgésicos dos opióides e por alguns dos efeitos adversos importantes como, por exemplo, sedação, euforia e dependência. A morfina, mesmo sendo um agonista opióide não seletivo, parece ter seus efeitos farmacológicos mais importantes mediados por este tipo de receptor (Rang et al., 2007).

Os receptores opióides podem causar sedação e disforia, no entanto a ativação dos receptores opióides do tipo κ parece produzir menos efeitos adversos (Rang et al., 2007).

O sistema opióide endógeno é complexo e sutil, estando os receptores opióides envolvidos também nos comportamentos exploratórios e motivacionais (Teodorov et al., 2008). Recentemente, foi demonstrado que o papel opioidérgico na seleção comportamental durante a lactação é plástico e adaptativo (Cruz et al., 2010). A ação combinada de hormônios esteróides como o estradiol e a progesterona resulta em mudanças na ligação de opióides no cérebro (Brunton e Russell, 2008; Sukikara et al., 2011; Teodorov et al., 2006). Assim, as sinapses opioidérgicas parecem intermediar a seleção comportamental entre caçar ou cuidar da prole em ratas lactantes. Alguns estudos repolatam que o tratamento com morfina durante a segunda metade da gestação atenua alguns componentes do comportamento materno enquanto aumenta algumas atividades não maternais nas mães (Miranda-Paiva et al., 2001; Slamberová et al., 2001).

Há diferenças na atividade dos genes de receptores opióides bem como na expressão das proteínas codificadas por esses genes entre ratas nulíparas e multíparas, sendo que nas últimas a experiência reprodutiva aumenta a expressão dos genes para os receptores opióides μ e κ na PAG das ratas (Teodorov et al., 2011).

Há locais ligações de receptores opióides estereoespecíficos no sistema nervoso central, sem uma distribuição uniforme (Brownstein et al., 1993). O receptor

opióide μ é amplamente distribuído pelo cérebro, variando as regiões de maior concentração do receptor de acordo com a espécie. Uma densidade moderada de receptores μ é encontrada na PAG e no núcleo da rafe (Mansour et al., 1988). Mann et al. (1991) observaram que a injeção do agonista do receptor opióide μ , DAMGO, i.c.v. em ratas lactantes é capaz de alterar o comportamento maternal de maneira dose-dependente.

Os receptores opióides κ tem um papel na imunidade, percepção dolorosa, fisiologia neuroendócrina, comportamento afetivo e cognição, podendo modular o comportamento reprodutivo em fêmeas (Teodorov et al., 2008).

Estudos sobre a influência dos opióides no comportamento materno, muitas vezes utilizam ferramentas farmacológicas. A morfina é o agonista opióide clássico, pois estimula vários tipos de receptores opióides, tais como o μ , o κ e o δ .

Para investigar o papel dos opióides endógenos, alguns trabalhos utilizam moléculas de peptídeos opióides, como a β -endorfina e a encefalina, que são substâncias endógenas. Como essas moléculas, em geral, não cruzam a barreira hematoencefálica em quantidades biologicamente ativas, elas precisam ser injetadas centralmente, ou no sistema ventricular, por onde se distribuem pelo encéfalo, ou em áreas específicas, como a área pré-óptica medial (MPOA) e a PAG lateral. Outra abordagem farmacológica elegante é investigar o papel dos opióides endógenos nos seus receptores por meio da utilização de antagonistas opióides. Assim, se uma droga tem o seu efeito inibido por um antagonista, isto é interpretado como decorrente da ligação desse antagonista com um receptor específico. Além disso, se uma função é inibida pelo uso do antagonista *per se*, isso sugere que aquela função dependia da ativação tônica daquele receptor por um ou mais opióides endógenos (Felicio e Canteras, 2008; Sukikara et al., 2007).

No entanto, ainda não se sabe a relevância funcional de cada um dos receptores opióides no contexto da seleção comportamental durante o pós-parto, sendo necessária uma investigação mais profunda nesta área. Do mesmo modo que injeções centrais de morfina (Moura et al., 2010), injeções centrais de agonista do receptor opióide μ (Mann et al., 1990) mostraram ser capazes de alterar o comportamento materno. Injeções periféricas agudas de um agonista opióide κ são capazes de aumentar a latência de captura dos filhotes pelas mães (Teodorov et al., 2008). Entretanto, a ação central dos agonistas desses receptores bem como da morfina frente à situação de cuidar da prole ou caçar ainda não foi estabelecida.

Sendo assim, analisaremos a importância dos receptores opióides μ , κ e da morfina no contexto da seleção comportamental mediada pela rPAGl.

1.4 Substância Cinzenta Periaquedutal

A substância cinzenta periaquedutal (PAG) é uma importante região do sistema nervoso central que está envolvida em vários mecanismos comportamentais e fisiológicos distintos: medo, ansiedade, antinocicepção, regulação autonômica, controle cardiovascular, comportamento de defesa ativa ou quiescente, vocalização, luta ou fuga, geração e elaboração de resposta de defesa de medo evocado, comportamento aversivo, comportamento de caça predatória, controle da micção, gerenciamento de estratégias ativas, comportamento de acasalamento e receptividade sexual e lordose sexual (Behbehani, 1995; Lovivk e Devall, 2009; Mota-Ortiz et al., 2009).

A PAG é a região do mesencéfalo que circunda o aqueduto cerebral. Sua porção mais rostral localiza-se ao nível da comissura posterior e a parte mais anterior do terceiro núcleo. Já a porção mais caudal localiza-se próximo ao núcleo tegmental dorsal (Behbehani, 1995). A figura 1 representa a subdivisão da PAG em sua porção mais rostral.

O circuito intrínseco majoritário dentro da PAG é uma rede GABAérgica ativa tonicamente, e sua inibição é um importante mecanismo de ativação de transmissão de sinal da PAG (Behbehani, 1995).

Figura 1 – Representação das subdivisões da PAG rostral

Distância de -6,04 mm do bregma. A região de interesse deste estudo é a LPAG. Aq: aqueduto; DMPAG: PAG dorsomedial; DLPAG: PAG dorsolateral; LPAG: PAG lateral; III: núcleo oculomotor; EW: núcleo de Edinger-Westphal.

Fonte: Adaptado de Paxinos e Watson (1998).

A PAG recebe uma grande variedade de projeções neurais ascendentes e descendentes. O hipotálamo é a região que mais possui aferências para a PAG, que também recebe *inputs* do tronco cerebral, do prosencéfalo basal e de regiões corticais. Os sistemas límbico, motor e autonômico possuem aferências para a região, sendo possível, portanto, que a PAG represente uma área de integração desses três sistemas (Beitz, 1982).

A rPAGI parece receber aferências de áreas do córtex pré-frontal envolvidas em controlar a atenção, em processos de tomada de decisão e no processo de busca por recompensa. A combinação única de conexões aferentes coloca a rPAGI em uma posição privilegiada para selecionar se a caça seria a resposta adaptativa mais apropriada (Mota-Ortiz et al., 2009, 2012).

A rPAGI é um local sensível a ação de opióides, que são determinantes na motivação para caça e forrageamento, sendo parte de um circuito neural envolvido na tomada de decisões como caçar, cuidar de filhotes, entre outras respostas comportamentais (Miranda-Paiva et al., 2003; Mota-Ortiz et al., 2009, 2012; Sukikara et al., 2006).

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo”.

Martin Luther King

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi investigar a relevância funcional dos receptores opióides μ e κ da rPAGI, bem como os efeitos da morfina neste sítio, na seleção dos comportamentos maternos e predatório de ratas durante a lactação.

Objetivos específicos:

- Avaliar a importância da ativação dos receptores opióides μ e κ , isoladamente, no contexto da seleção cuidar do filhote *versus* caçar durante a lactação.
- Analisar a influência da morfina, um agonista opióide não seletivo, sobre os parâmetros de caça e cuidado materno no paradigma de seleção comportamental.
- Avaliar as alterações comportamentais causadas pelo bloqueio dos receptores opióides μ ou κ frente a ação da morfina na rPAGI, bem como a importância funcional desse bloqueio.

**“... mas eu desconfio que a única
pessoa livre, realmente livre, é a que
não tem medo do ridículo”.
Luís Fernando Veríssimo**

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas 71 ratas (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* virgens, com aproximadamente 80 dias de idade, provenientes 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 ± 2 °C) e ciclo de luz de 12h claro: 12h escuro (06:00h – 18:00h). Água e comida foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento. Este estudo está de acordo com os “Princípios Éticos de Experimentação Animal” adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (protocolo n.º 1960/2010) e do Instituto de Ciências Biomédicas (protocolo n.º 068 nas fls. 88 do livro 02), ambas da Universidade de São Paulo.

3.2 Acasalamentos e padronização da ninhada

As ratas virgens foram colocadas na presença de um macho sexualmente experiente na proporção de duas fêmeas para cada macho, para acasalamento. Diariamente, no início do período claro do ciclo, foi realizada a análise do lavado vaginal nas fêmeas, e no dia em que era verificada a presença de espermatozóides no lavado das mesmas, este era considerando o dia 1 (um) de prenhez. Depois de constatada a prenhez, as ratas foram mantidas individualmente até o momento do teste comportamental. Entre os dias 15 e 17 de prenhez, as fêmeas foram submetidas à cirurgia estereotóxica para implantação de cânula guia como descrito a seguir.

Os partos foram monitorados diariamente até as 14 h, sendo os partos ocorridos após este horário considerados como tendo ocorrido no dia posterior. O dia do parto foi considerado como dia 0 (zero) de lactação. No dia 2 (dois) de lactação, foram realizadas a contagem e sexagem dos filhotes, de modo que as ninhadas eram padronizadas em oito neonatos, sendo quatro machos e quatro fêmeas por mãe, sempre que possível.

3.3 Cirurgia estereotáxica para implantação de cânula guia

As fêmeas prenhes foram anestesiadas entre os dias 15 e 17 de prenhez, via intraperitoneal, com uma mistura de ketamina (50mg/Kg – Vetanarcol[®], Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e xilazina (5mg/Kg – Kensol[®], Santana de Parnaíba, SP, Brasil). Para analgesia pós-operatória foi utilizado dipirona sódica (Ibasa, Porto Alegre, RS, Brasil), via subcutânea, na dose de 30mg/Kg. Em seguida, as ratas foram colocadas no equipamento estereotáxico (Kopf Instrument – Model 900, Tujunga, CA, EUA) para realização da cirurgia. Foi implantada uma cânula guia unilateralmente (Plastics One Inc., Roanoke, VI, EUA) na área da substância cinzenta periaquedutal rostro-lateral (rPAGl). As medidas para a realização da cirurgia foram tomadas com base no bregma sobre a linha média da região rostral da calota craniana. Uma vez tomada essa medida, foi definida a localização da cânula utilizando-se as seguintes coordenadas: anteroposterior = -6,0 mm do bregma; médio-lateral = -0,6 mm; dorso-ventral = -4,2 mm, de acordo com o atlas Paxinos e Watson (1998). O uso de uma agulha injetora 1 mm mais longa que a cânula guia, permitiu que fossem feitas as injeções na rPAGl com grande precisão.

Por meio de broca odontológica, foram realizadas quatro aberturas na calota craniana: uma profunda, próxima ao seio venoso sagital, para a introdução da cânula guia, e outras três superficiais para ancorar três parafusos de sustentação (Plastics One Inc., Roanoke, VI, EUA). A cânula e os parafusos foram fixados com o auxílio de resina acrílica auto polimerizante JET (Clássico[®], Campo Limpo Paulista, SP, Brasil). Ao término da cirurgia, as ratas eram suturadas, sendo aplicado no local pomada antibiótica neomicina e bacitracina (Medley[®], Campinas, SP, Brasil), e em seguida, foram mantidas em local aquecido até completa recuperação da anestesia. Os animais continuaram sendo mantidos individualmente nas gaiolas moradias sendo administrado analgésico (dipirona sódica – 3mg/mL) na água dos mesmos durante dois dias consecutivos para analgesia no período pós-operatório.

3.4 Habituação e manipulação dos animais

Com a finalidade de promover a habituação do animal ao aparato experimental e a manipulação por ele sofrida no dia da avaliação comportamental, no dia anterior ao teste, as fêmeas foram habituadas durante 30 minutos na gaiola

experimental e também sofreram manipulação da cânula guia. Este procedimento torna-se essencial, uma vez que o teste não é realizado na gaiola moradia, e sim em uma caixa de acrílico (Figura 2) especialmente projetada para melhor visualização e filmagem dos comportamentos apresentados pelos animais. O tempo de habituação foi igual ao tempo de observação no dia do teste.

Figura 2 – Aparato experimental utilizado para realização e filmagem dos testes comportamentais

Em (A) tem-se a disposição da câmera para filmagem do comportamento do animal, e em (B) a caixa de acrílico utilizada para o teste.

Fonte: Klein (2012).

3.5 *Teste comportamental*

Os testes comportamentais, que confrontam os comportamentos materno e predatório, foram realizados nos dias 5 (cinco) ou 6 (seis) de lactação, durante o período da manhã. Este é o período no qual o comportamento maternal ocorre em sua maior intensidade (Numan et al., 2006). As lactantes foram privadas de comida, água e de seus filhotes uma hora antes do início do teste comportamental.

Trinta minutos antes do teste, os animais receberam as doses da droga de cada grupo a que pertencem (vide itens 3.6 Drogas e doses utilizadas e 3.7 Delineamento experimental). As drogas foram injetadas na PAG rostro-lateral das fêmeas via cânula guia.

O teste comportamental foi iniciado aos 60 minutos após a separação dos filhotes da mãe e 30 minutos após a injeção da droga. Foram colocados no aparato experimental ao qual estava a fêmea lactante, seus oito filhotes para estimulação do comportamento materno, e imediatamente após serem colocados os neonatos,

foram introduzidas cinco baratas (*Leurolestes circunvagans*) vivas e íntegras como estímulo à predação. O tempo de teste foi de 30 minutos consecutivos (1800s), sendo todos os animais filmados para posterior análise do comportamento (Cruz et al., 2010; Moura et al., 2010; Sukikara et al., 2006).

Em todas as avaliações, a caixa de testes era lavada com uma solução de álcool 70% antes do teste para eliminar qualquer viés de possíveis odores deixados por outro animal testado previamente. Todos os animais foram testados apenas uma única vez, e para minimizar possíveis influências do ciclo circadiano no comportamento, as observações dos animais dos grupos experimentais e controle foram intercaladas.

3.6 Drogas e doses utilizadas

✓ Agonista do receptor opióide μ : DAMGO

[D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]-Encefalina - (Sigma-Aldric[®], St. Louis, MO, EUA)

✓ Antagonista do receptor opióide μ : CTAP

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂ - (Tocris Bioscience[®], Ellisville, MO, EUA)

✓ Agonista do receptor opióide κ : U69593

(+)-(5 α ,7 α ,8 β)-N-Metil-N-[7-(1-pirrolidinil)-1-oxaspiro[4,5]dec-8-il]-Benzeneacetamida - (Sigma-Aldrich[®])

✓ Antagonista do receptor opióide κ : nor-Binaltorphimine dihydrochloride

17,17'-(Dicyclopropylmethyl)-6,6',7,7'-6,6'-imino-7,7'-binorphinan-3,4',14,14'-tetrol dihydrochloride - (Tocris Bioscience[®])

✓ Sulfato de morfina – ampola contendo 10mg de droga em 1mL de veículo (Dimorf, Laboratório Cristália[®], São Paulo, SP, Brasil).

Para os agonistas e antagonistas dos receptores opióides μ e κ , foi utilizada a dose de 10 nmol da droga em 0,6 μ L. A dose de morfina utilizada foi de 6 μ g em 0,6 μ L e o grupo controle recebeu 0,6 μ L de solução fisiológica 0,9% (veículo) (Quadro 1).

Quadro 1 – Concentrações das drogas utilizadas (em nmol e µg) para cada grupo experimental

Drogas	Dose	
	nmol	µg
DAMGO	10,00	5,136
CTAP	10,00	11,043
U-69593	10,00	3,565
nor-Binaltorphimine	10,00	7,347
Sulfato de morfina	7,91	6,000

Fonte: Klein (2012).

Não foram utilizadas doses equimolares do sulfato de morfina e as demais drogas, por questões técnicas, devido ao fato de a morfina ser comercializada já diluída, não sendo possível concentrá-la para evitar que um volume muito grande de droga tivesse que ser injetado em uma área pequena como é a rPAGI, o que poderia causar danos ao animal. Ademais, a referida dose de sulfato de morfina já havia sido utilizada para avaliação do comportamento materno anteriormente (Moura et al., 2010).

3.7 Delineamento experimental

No momento do teste, as fêmeas receberam, via cânula guia, por meio de seringa Hamilton® (Hamilton Company, Reno, NV, EUA) acoplada a uma bomba de infusão (Harvard Apparatus®, Holliston, MA, EUA), dose da droga do grupo a qual fazia parte.

Este estudo foi dividido em dois experimentos:

✓ Experimento 1, no qual os animais receberam dose única de agonista μ -opióide (**grupo μ** – n=12), ou agonista κ -opióide (**grupo κ** – n=12), ou sulfato de morfina (**grupo MOR** – n=12), ou solução salina 0,9% (**grupo CS** – n=12);

✓ Experimento 2, realizado em uma segunda etapa para avaliar a ação de cada tipo de receptor frente a injeção de morfina, onde os animais receberam injeção na rPAGI de antagonista μ -opióide seguido de sulfato de morfina (**grupo N μ M** – n=11), ou antagonista κ -opióide seguido de sulfato de morfina (**grupo N κ M** – n=12), sendo comparados aos grupos CS e MOR já mencionados.

O volume de 0,6µL de cada droga foi injetado constantemente durante 30 segundos, e a cânula injetora permaneceu acoplada à cânula guia por mais 30 segundos após o término da injeção (Moura et al., 2010).

Nos grupos NµM e NκM do Experimento 2, onde os animais receberam duas injeções consecutivas, primeiramente procedeu-se a injeção do antagonista e em seguida foi realizada a injeção do sulfato de morfina, obedecendo-se os tempos de 30 segundos de infusão e 30 segundos de permanência da cânula guia após a injeção de cada droga, com um minuto de intervalo entre as duas injeções (Simmons e Self, 2009).

Após a realização do teste comportamental para cada animal, foi realizada perfusão transcardíaca dos mesmos, como descrito a seguir, e os encéfalos das fêmeas foram retirados para confirmação do local de injeção da cânula. Somente foram utilizados para este estudo animais que tiveram a cânula implantada corretamente na rPAGI.

Na Figura 3 tem-se uma linha do tempo que esquematiza todos os procedimentos realizados com os animais desde a confirmação da prenhez até o dia do teste experimental.

Figura 3 – Representação esquemática do delineamento experimental

Fonte: Klein (2012).

3.8 Perfusão transcardíaca

Após o registro dos comportamentos maternal e predatório, as ratas foram profundamente anestesiadas com ketamina (60mg/Kg - Vetanarcol®) e xilasina (10mg/Kg - Kensol®) e perfundidas por via trans aórtica inicialmente com 300 mL de uma solução salina 0,9%, seguida de 400 mL de uma solução fixadora, composta

por 4% de paraformaldeído (Synth[®], Diadema, SP, Brasil) e 4% de tetraborato de sódio decaidratado (Alfa Aesar[®], Ward Hill, MA, EUA) em pH 9,4, a 4^o C).

Ao final da passagem do fixador, o encéfalo foi cuidadosamente retirado do crânio, e pós-fixado na mesma solução fixadora acrescida de sacarose 20% (Synth[®], Diadema, SP, Brasil) durante aproximadamente 24 horas, sendo após esse período crio-seccionado em cortes coronais de 30 µm de espessura, utilizando-se micrótomo de congelamento (Leica Microsystems[®], Nussloch, Baden-Württemberg, Alemanha). Pode-se fazer a verificação correta da cânula a partir dos cortes obtidos.

3.9 Análises comportamentais

Todos os parâmetros do comportamento maternal e predatório foram analisados com o auxílio do programa de análises comportamentais Etholog 2.2 (Ottoni, 2000).

Foram analisados os seguintes parâmetros comportamentais durante os 30 minutos de teste (1800s) no qual a fêmea permaneceu na caixa experimental com os filhotes e os insetos, conforme indica a Quadro 2.

Quadro 2 – Parâmetros comportamentais analisados durante o teste comportamental

COMPORTAMENTO MATERNAL	COMPORTAMENTO PREDATÓRIO	OUTROS
Cifose fisiológica	Nº de contatos com insetos	Tempo em que o animal fica explorando a caixa experimental
Nº de contatos com filhotes	Tempo comendo insetos	Tempo em que o animal fica parado
Busca do 1º, 5º e 8º filhotes	Latência para captura do 1º, 2º, 3º, 4º e 5º insetos	Nº de linhas que o animal cruza na caixa
N.º de vezes em que a fêmea busca os filhotes	Número de insetos capturados	Auto limpeza
Lamber e limpar os filhotes		
Agrupamento dos filhotes		
Comportamento materno total (CMT)		

Fonte: Klein (2012).

A busca dos filhotes aconteceu quando a fêmea procurou-os na caixa para agrupá-los em um único local, considerado por ela como o “ninho”, apesar de não haver maravalha na caixa experimental, é o local escolhido pela fêmea para agrupar sua prole. Cifose fisiológica é quando a fêmea forma um arco com a sua coluna, expondo assim o máximo possível suas mamas para os filhotes serem amamentados adequadamente (Figura 4). Considerou-se Cifose (-) quando a fêmea realizou cifose sobre quatro ou menos filhotes, não sendo possível realizar o comportamento materno total (FMB), que é a expressão completa do comportamento materno, permanecendo a rata durante três minutos consecutivos ou mais na posição de cifose fisiológica. Já a Cifose (+) foi considerado quando a fêmea ficou na posição de cifose sobre cinco ou mais filhotes, podendo então realizar o comportamento materno total caso permanecesse sobre eles por três minutos consecutivos (Cruz et al., 2010). Stern e Johnson (1990) afirmam que a probabilidade e a velocidade que a mãe assume a posição de cifose, assim como as

ejeções subseqüentes de leite, estão diretamente relacionadas ao número de filhotes ativos no ninho.

Figura 4 – Fêmea com cânula guia implantada em cifose fisiológica

Repare no arqueamento da coluna do animal, permitindo uma melhor exposição das mamas aos filhotes.

Fonte: Klein (2012).

O número de linhas que o animal cruza na caixa experimental indica a locomoção da fêmea durante o tempo de análise. Na figura 5, tem-se a representação esquemática de como estas linhas estão dispostas na caixa de teste.

Figura 5 – Representação esquemática da disposição das linhas perpendiculares (pretas) que o animal cruza na caixa experimental.

Vista superior da caixa.

Fonte: Klein (2012).

Para avaliação dos parâmetros comportamentais materno de busca aos filhotes, foi utilizada a seguinte escala de escore que tem por base a latência para iniciar determinado comportamento, conforme se observa no quadro 3:

Quadro 3 – Escala de escores em relação ao tempo de teste.

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

Fonte: Klein (2012).

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, e o teste *post hoc* de Tukey para comparações grupo a grupo, para dados paramétricos. Para dados não paramétricos, como a latência para busca aos filhotes, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de multicomparações de Dunn. O teste exato de Fisher foi aplicado para comparações do percentual de animais que apresentaram determinados parâmetros do comportamento maternal e predatório, como percentual de animais que agruparam os filhotes, percentual de animais que realizaram comportamento materno total (CMB), percentual de animais que capturaram cada um dos insetos, entre outros. Foi utilizado o teste de Correlação de Pearson para comparações da latência para captura de cada barata com o tempo em que o animal permaneceu parado no Experimento 2. Foi considerada a probabilidade significativa sempre que $p < 0,05$ para todos os testes.

**“O segredo é não correr atrás das
borboletas... É cuidar do jardim para
que elas venham até você”.**

Mário Quintana

4 RESULTADOS

Somente foram utilizados, para este estudo, animais que possuíam a cânula implantada corretamente na substância cinzenta periaquedutal rostro-lateral (Figura 6).

Figura 6 – Fotomicrografia de cânula implantada na rPAGI

Fotomicrografia que mostra a cânula corretamente implantada na rPAGI, sendo que a porção final representa a agulha injetora que atinge a região, mantendo-a íntegra. A cânula foi implantada unilateralmente em todos os animais. O traçado contínuo delimita a área da substância cinzenta periaquedutal, e o traçado pontilhado delimita a rPAGI. Aumento de 20x, sem coloração. Aq: aqueduto; rPAGI: substância cinzenta periaquedutal rostro-lateral.

Fonte: Klein (2012).

Os diagramas abaixo representam o local de injeção das drogas de cada um dos grupos (Figuras 7, 8 e 9).

Figura 7 – Local das injeções na rPAGI dos grupos CS e MOR

Mostra os principais locais das injeções. As elipses não preenchidas representam as injeções do grupo controle (CS) e as elipses preenchidas as do grupo que recebeu morfina (MOR). Devido à sobreposição, o número de pontos ilustrados pode ser menor que o número de injeções que efetivamente ocorreram. Cada figura representa os valores das regiões da PAG posteriores ao bregma (-5,8 mm; 6,04 mm; -6,3 mm e -6,8 mm). Aq: aqueduto; EW: núcleo de Edinger-Westphal. Fonte: Diagrama modificado de Paxinos e Watson (1998).

Figura 8 – Local das injeções na rPAGI dos grupos μ e κ

Mostra os principais locais das injeções. Os retângulos não preenchidos representam as injeções do grupo CS e os retângulos preenchidos as do grupo MOR. Devido à sobreposição, o número de pontos ilustrados pode ser menor que o número de injeções que efetivamente ocorreram. Cada figura representa os valores das regiões da PAG posteriores ao bregma (-5,8 mm; 6,04 mm; -6,3 mm; -6,72 mm e -6,8 mm). Aq: aqueduto; EW: núcleo de Edinger-Westphal. Fonte: Diagrama modificado de Paxinos e Watson (1998).

Figura 9 – Local das injeções na rPAGI dos grupos N μ M e N κ M

Mostra os principais locais das injeções. Os hexágonos não preenchidos representam as injeções do grupo μ e os hexágonos preenchidos as injeções do grupo MOR. Devido à sobreposição, o número de pontos ilustrados pode ser menor que o número de injeções que efetivamente ocorreram. Cada figura representa os valores das regiões da PAG posteriores ao bregma (-5,8 mm; 6,04 mm; -6,3 mm; -6,72 mm e -6,8 mm). Aq: aqueduto; EW: núcleo de Edinger-Westphal.

Fonte: Diagrama modificado de Paxinos e Watson (1998).

Os resultados serão apresentados separadamente para cada um dos experimentos, mesmo sendo os grupos CS e MOR comuns a ambos:

a) Experimento 1

O experimento 1 testou a ação dos agonistas dos receptores opióides μ e κ , bem como da morfina, frente a seleção de comportamentos materno e predatório em ratas lactantes.

A injeção central de morfina foi capaz de promover a inibição do comportamento materno nas fêmeas lactantes. No entanto, nenhum dos grupos teve seu comportamento predatório alterado de maneira significativa em relação aos do grupo CS (Figura 10).

Figura 10 – Número médio de baratas capturadas por cada grupo experimental em 1800s de teste do Experimento 1

Os animais foram tratados com salina (grupo CS), 7,91 nmol de morfina (grupo MOR), 10 nmol de DAMGO (agonista μ - grupo μ), 10 nmol de U69593 (agonista κ - grupo κ). ANOVA de uma via ($p > 0,05$). CS, MOR, μ e κ $n=12$. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M.
 Fonte: Klein (2012).

A latência para captura de cada uma das baratas também não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 11). Nesse sentido, o percentual de animais que capturaram cada uma das baratas também não mostrou diferença entre os grupos, como mostra a Figura 12. Aproximadamente 80% dos animais de cada grupo capturaram a primeira barata, enquanto que cerca de 60% dos animais dos grupos CS, MOR e μ capturaram a 5ª e última barata. No grupo κ , o percentual de animais que capturou a 5ª barata foi de aproximadamente 30%, mas não apresentou diferença estatisticamente significativa.

Figura 11 – Latência para captura das baratas do Experimento 1

Em (A), latência para captura da 1ª barata. (B) apresenta a latência para captura da 2ª barata, em (C) tem-se a latência para captura do 3º inseto. Em (D) a latência para captura do 4º inseto e (E) apresenta a latência para captura da 5ª barata. CS: grupo controle; MOR: grupo morfina; μ : grupo que recebeu injeções do agonista μ -opiíide; κ : grupo agonista κ . (CS, MOR, μ e κ n=12). Os dados são apresentados como média $\pm$ E.P.M. ANOVA de uma via ($p > 0,05$).

Fonte: Klein (2012).

Figura 12 – Percentual de captura dos insetos do Experimento 1

(A) apresenta o percentual de animais que capturaram a 1ª barata, em (B) tem-se o percentual de captura do 2º inseto, em (C) o do 3º. (D) mostra o percentual de captura da 4ª barata e em (E) o percentual de animais de cada grupo que capturou o 5º e último inseto. CS indica o grupo controle, MOR apresenta o grupo que recebeu injeção na rPAGI de morfina, μ indica o grupo que recebeu injeção do agonista μ e κ é o grupo que recebeu o agonista do receptor opióide κ. (n = 12 para cada um dos grupos). Teste de Fisher ($p > 0,05$).

Fonte: Klein (2012).

Ainda em relação aos parâmetros comportamentais de caça predatória, não existiram diferenças significantes no número de contatos que os animais de cada

grupo tiveram com as baratas, bem como o tempo médio que cada grupo gastou para comer as baratas não foi diferente (Figura 13).

Figura 13 – Parâmetros do comportamento de caça predatória entre os grupos do Experimento 1

Em (A) tem-se o número de contatos que a fêmea teve com as baratas durante o teste experimental e em (B) o tempo gasto pelas lactantes comendo as baratas. CS, MOR, μ e κ $n=12$. Os dados são apresentados como média $\pm$ E.P.M. ANOVA de uma via ($p > 0,05$).

Fonte: Klein (2012).

Em relação à atividade geral dos animais, foi calculado o tempo em que os animais exploravam o ambiente, o número de vezes que os animais cruzavam linhas perpendiculares existentes no fundo da caixa experimental, o tempo em que os mesmos permaneceram parados durante o teste comportamental e ainda o tempo gasto fazendo auto-limpeza. O tempo gasto explorando a caixa de testes pelas fêmeas de cada um dos grupos não se mostrou alterado. No entanto, o grupo que recebeu injeções de morfina na rPAGI (grupo MOR), apresentou menor número de linhas cruzadas quando comparado ao grupo controle (CS), bem como o tempo gasto realizando auto-limpeza. O tempo em que o grupo MOR permaneceu parado foi maior em relação aos grupos CS e κ (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros de tempo que a fêmea explorou o ambiente, número de linhas cruzadas, tempo em que os animais permaneceram parados e realizando auto-limpeza do Experimento 1

Parâmetro	CS	MOR	μ	κ
Explorando o ambiente (s)	940±79,6	728±54,6	807±54,7	805±57,6
Número de linhas cruzadas	109±14,7	64±7,9*	70±6,5	86±9,5
Parado (s)	67±19,7	435±86,8 [#]	202±76,6	101±33,1
Auto-limpeza (s)	166±29,9	63±10,1*	141±21,7	135±17,8

Os dados são apresentados como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (CS). [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo CS e κ (CS, μ, κ e MOR n=12). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

Fonte: Klein (2012).

Em relação aos parâmetros do comportamento maternal, as fêmeas do grupo MOR apresentaram um maior escore de latência para captura do 1º, 5º e 8º filhotes (Figura 14 A, B e C) quando comparados ao grupo CS, ou seja, as fêmeas do grupo MOR levaram mais tempo para buscar seus filhotes do que as fêmeas do grupo controle. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à latência para busca do 1º ao 8º filhote (Figura 14D).

Assim como a latência para buscar cada filhote mostrou-se alterada nos animais que receberam injeções centrais de morfina, o percentual de mães que realizaram a busca por seus filhotes nesse grupo foi menor quando comparado ao grupo controle (Figura 15). Mesmo não havendo diferenças estatísticas, o grupo CS foi o único em que todas as fêmeas buscaram o primeiro filhote.

O tempo em que as mães permaneceram lambendo seus filhotes foi menor nas fêmeas do grupo MOR quando comparado ao grupo μ e κ. O tempo em que as lactantes gastaram agrupando os filhotes, o número de contatos com os filhotes e o número de buscas aos filhotes não se mostraram diferentes entre os grupos experimentais (Figura 16).

Figura 14 – Latência para busca dos filhotes do Experimento 1

(A) mostra a latência para busca do 1º filhote. Em (B) a latência para busca do 5º filhote, em (C) a latência para busca do 5º e último filhote. (D) mostra a latência para busca do 1º ao 8º filhote. CS indica o grupo controle, o grupo que recebeu injeção de morfina é representado como MOR, μ indica o grupo que recebeu injeções locais do agonista μ , e κ o grupo que recebeu agonista κ -opióide. Os dados são apresentados como mediana (mínimo e máximo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo CS. $n = 12$ para todos os grupos. Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Fonte: Klein (2012).

Figura 15 – Percentual de mães que buscaram os filhotes no Experimento 1

Percentual de mães que buscaram o 1º, o 5º e o 8º filhotes. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (CS). CS, MOR μ e κ $n = 12$. Teste de Fisher.

Fonte: Klein (2012).

Figura 16 – Parâmetros de cuidados com os filhotes no Experimento 1

Em (A) o tempo gasto pelas mães lambendo seus filhotes, (B) apresenta o tempo gasto pelas mães agrupando os neonatos. Em (C) tem-se o número de contatos com os filhotes, e em (D) o número de buscas feitas a eles. * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos μ e κ . CS, MOR, μ e κ $n = 12$. Os dados são mostrados em média $\pm$ E.P.M. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. Fonte: Klein (2012).

O comportamento materno total (CMT) não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos, sendo que no grupo CS o percentual de fêmeas que realizaram esse comportamento não foi relevante (apenas 8,3%), mesmo que entre o grupo MOR nenhum animal tenha realizado o CMT. Também não houve diferenças no percentual de realização de Cífose (-) e Cífose (+) (Figura 17).

Figura 17 – Percentual de lactantes que realizaram Cifose (-), Cifose (+) e comportamento materno total no Experimento 1

Cifose (-) foi caracterizada quando a mãe realizou cifose sobre 4 ou menos filhotes. Cifose (+) caracterizou-se pela permanência da mãe nessa posição sobre 5 ou mais filhotes. Considerou-se como comportamento materno total (CMT) quando a mãe permaneceu por 3 ou mais minutos consecutivos em cifose (+). CS indica o grupo controle, o grupo que recebeu injeção de morfina é representado como MOR, μ indica o grupo que recebeu injeções locais do agonista μ , e κ o grupo que recebeu agonista κ -opióide. $n = 12$ para todos os grupos. Teste de Fisher ($p > 0,05$). Fonte: Klein (2012).

Na intenção de observar qual a motivação nos minutos iniciais de teste, se as fêmeas de cada grupo optavam por caçar antes ou depois de cuidar de sua prole, foi analisado o número de insetos capturados nos primeiros 15 minutos (900s) e no tempo total de teste e o número de filhotes buscados nos 900s iniciais e no tempo total de observação (Tabela 2). O grupo MOR teve o parâmetro de busca aos filhotes claramente alterado pelas injeções de morfina na rPAGI. Nos minutos iniciais de teste, a busca aos filhotes por esse grupo, apesar de não ser estatisticamente significativa, é relevante, considerando que $p = 0,057$ comparado ao grupo controle. No entanto, não houve diferenças significativas entre os grupos no número de baratas capturadas no início e no tempo total de teste.

Tabela 2 – Número de baratas capturadas e filhotes buscados nos 15 minutos iniciais (900 s) e no tempo total de teste (1800 s) do Experimento 1

Parâmetro	Grupos			
	CS	MOR	μ	κ
N.º de baratas capturadas até 900 s	2 (0 -5)	4,5 (0 – 5)	3,5 (0 – 5)	0 (0 – 5)
N.º de baratas capturadas (1800 s)	5 (0 -5)	5 (0 – 5)	5 (0 – 5)	3 (0 – 5)
N.º de filhotes buscados até 900s	7 (0 -8)	0 (0 – 8)	5 (0 – 8)	6 (0 – 8)
N.º de filhotes buscados (1800 s)	8 (2 – 8)	0,5 (0 – 8)*	5,5 (0 – 8)	8 (0 – 8)

Dados expressos em mediana (mínimo – máximo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo CS, (CS, MOR, μ e κ n=12). Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Fonte: Klein (2012).

b) Experimento 2

Em vista dos resultados encontrados no Experimento 1, que mostraram que a morfina foi capaz de inibir o comportamento materno das ratas, o Experimento 2 foi delineado na tentativa de elucidar melhor a ação da morfina nesse paradigma, bem como a importância específica dos receptores μ e κ sob a ação da mesma. Assim, foram comparados os grupos controle (CS), morfina (MOR), antagonista μ e morfina (N μ M) e antagonista do receptor opióide κ mais morfina (N κ M).

A atividade geral dos animais foi medida e comparada (Tabela 3). Todos os grupos que receberam injeção de morfina (MOR, N μ M e N κ M) ficaram mais tempo parados em relação ao grupo controle, no entanto, somente o grupo MOR gastou menos tempo realizando auto-limpeza quando comparado ao grupo CS. O número de linhas cruzadas e o tempo gasto pelo animal explorando o ambiente não apresentaram resultados estatisticamente significantes.

Tabela 3 – Parâmetros de tempo que o animal gastou explorando o ambiente, número de linhas cruzadas, tempo em que os animais permaneceram parados e realizando auto-limpeza no Experimento 2

Parâmetro	Grupos			
	CS	MOR	N μ M	N κ M
Explorando o ambiente (s)	940 $\pm$ 79,6	728 $\pm$ 54,6	899 $\pm$ 127	886 $\pm$ 59,1
Número de linhas cruzadas	109 $\pm$ 14,7	64 $\pm$ 7,9	139 $\pm$ 50,8	73 $\pm$ 11,9
Parado (s)	67 $\pm$ 19,7	435 $\pm$ 86,8*	638 $\pm$ 159,3*	492 $\pm$ 118,8*
Auto-limpeza (s)	166 $\pm$ 29,9	63 $\pm$ 10,1*	124 $\pm$ 19,6	105 $\pm$ 24,7

Os dados são apresentados como média $\pm$ E.P.M. * indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (CS). (CS, MOR e N κ M $n=12$, N μ M $n=11$). Como os grupos apresentaram uma variância amostral significativa, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações grupo a grupo.

Fonte: Klein (2012).

O comportamento predatório dos animais, no geral, mostrou-se alterado em relação aos demais grupos apenas para o grupo N μ M, como podemos observar na Figura 18, onde mostra o número médio de baratas capturadas pelas lactantes durante o teste comportamental.

Figura 18 – Número médio de baratas capturadas por cada grupo no Experimento 2

Os animais foram tratados com salina (grupo CS), 7,91 nmol de morfina (grupo MOR), 10 nmol de CTAP (antagonista μ -opióide) seguido de 7,91 nmol de morfina (grupo N μ M) ou 10 nmol de nor-Binaltorphimine (antagonista do receptor opióide κ) seguido de 7,91 nmol de morfina (grupo N κ M). * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos CS e MOR. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. (CS, MOR e N κ M $n=12$, N μ M $n=11$). Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M.

Fonte: Klein (2012).

A latência para captura de cada uma das baratas também se mostrou alterada no grupo NμM, mas apenas para a captura do 2º e 3º insetos, comparados aos grupos CS e MOR (Figura 19). Tendo em vista que os animais permaneceram por mais tempo parados nos grupos que receberam morfina, foi testada uma correlação entre o tempo em que o animal permaneceu parado e a latência para captura de cada um dos insetos, principalmente para o grupo NμM, como mostra a Figura 20. Foi encontrada correlação positiva apenas para o grupo NkM na latência para busca do 1º ($r = 0,60$; $p = 0,038$), 2º ($r = 0,64$; $p = 0,025$), 3º ($r = 0,76$; $p = 0,004$) e 4º insetos ($r = 0,69$; $p = 0,012$). Ainda em relação ao comportamento predatório, os animais do grupo NμM tiveram um menor percentual de captura do 1º, 2º, 3º e 4º insetos comparados aos grupos controle e morfina, e o percentual de animais que capturou o 5º inseto mostrou-se diminuído em relação ao grupo controle (Figura 21).

Figura 19 – Latência para captura das baratas no Experimento 2

Em (A), latência para captura da primeira barata, (B) latência para captura da segunda barata, (C) mostra a latência para captura do terceiro inseto. Em (D), latência para captura da quarta barata. (E) mostra a latência para captura do quinto inseto. Os dados são apresentados como média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$ em relação aos grupos CS e MOR. CS, MOR e N κ M $n = 12$ e N μ M $n = 11$. ANOVA de uma via com teste de Tukey para comparações grupo a grupo. Fonte: Klein (2012).

Figura 20 – Correlação entre a latência para captura de cada inseto e o tempo em que o animal permaneceu parado entre os grupos que receberam injeções locais de morfina do Experimento 2

Em (A) a correlação entre o tempo em que os animais permaneceram parados e a latência para captura da 1ª barata. (B) mostra a correlação entre o tempo de parado e a latência para captura do 2º inseto. Em (C) tem-se a representação da correlação entre o tempo em que os animais ficaram parados e a latência para captura da 3ª barata, (D) a correlação com a 4ª barata e (E) a correlação entre o tempo parado e a latência para captura do 5º inseto. CS, MOR e N κ M $n = 12$ e N μ M $n = 11$. Correlação positiva foi encontrada apenas para o grupo N κ M na latência para busca do 1º ($r = 0,60$; $p = 0,038$), 2º ($r = 0,64$; $p = 0,025$), 3º ($r = 0,76$; $p = 0,004$) e 4º insetos ($r = 0,69$; $p = 0,012$). MOR: grupo morfina; N μ M: grupo com injeções do antagonista μ e morfina; N κ M: grupo que recebeu injeções de antagonista κ e morfina consecutivamente. Correlação de Pearson.

Fonte: Klein (2012).

Figura 21 – Percentual de animais que capturaram as baratas no Experimento 2

(A) mostra o percentual de fêmeas que capturaram a primeira barata, em (B) o percentual de animais que capturaram a segunda barata, (C) a terceira, (D) apresenta o percentual de fêmeas que capturaram a quarta, e (E) representa o percentual de fêmeas que capturaram a quinta barata. * $p < 0,05$ comparados aos grupos CS e MOR. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. CS, MOR e N κ M $n = 12$ e N μ M $n = 11$. Teste de Fisher.
 Fonte: Klein (2012).

Ainda em relação aos parâmetros do comportamento predatório, foram calculados o número de contatos que as fêmeas tiveram com os insetos e o tempo

gasto comendo-os. Da mesma maneira, somente o grupo N μ M teve o parâmetro de tempo gasto ingerindo as baratas alterado em relação ao grupo controle (Figura 22).

Figura 22 – Parâmetros do comportamento de caça predatória no Experimento 2

Em (A) tem-se o número de contatos dos animais de cada um dos grupos com as baratas. (B) apresenta o tempo gasto pelos animais comendo os insetos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CS. Os dados são apresentados em média $\pm$ E.P.M. (CS, MOR e N κ M $n=12$, N μ M $n=11$). ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey para comparações grupo a grupo.

Fonte: Klein (2012).

Em relação aos parâmetros do comportamento maternal, as fêmeas dos grupos MOR, N μ M e N κ M apresentaram um maior escore de latência para captura do 1º, 5º e 8º filhotes (Figura 23 A, B e C) quando comparados ao grupo CS, ou seja, as fêmeas destes grupos levaram um tempo maior para buscar seus filhotes do que as fêmeas do grupo controle (CS). Entretanto, apenas o grupo N μ M teve o maior escore de latência para busca do 1º ao 8º filhotes estatisticamente significativo em relação ao grupo CS (Figura 23 D).

Sendo assim, além da maior latência para busca aos filhotes, as fêmeas dos grupos que receberam injeções na rPAGI de morfina apresentaram o percentual de buscas ao 1º, 5º e 8º filhotes menor do que o grupo controle (Figura 24). No grupo N μ M, apenas cerca de 20% das fêmeas buscaram o primeiro filhote, e nenhuma delas executou essa tarefa em relação ao último neonato.

Figura 23 – Escores de latência para busca aos filhotes no Experimento 2

Em (A), a latência para busca do primeiro filhote, (B) mostra a latência para busca do quinto neonato. Em (C) a latência para busca do oitavo e último filhote. (D) apresenta a latência para captura do primeiro ao oitavo lactente. Os dados são mostrados como mediana e variação mínima e máxima. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. CS, MOR e N κ M $n = 12$, N μ M $n = 11$. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Fonte: Klein (2012).

Figura 24 – Percentual de animais que buscaram o primeiro, quinto e oitavo filhote no Experimento 2

CS representa o grupo controle, MOR indica o grupo que recebeu 7,91 nmol de morfina na rPAGI, os animais que receberam 10 nmol de antagonista μ -opióide e 7,91 nmol de morfina compõem o grupo NμM, e o grupo NκM que recebeu 10 nmol de antagonista κ e 7,91 nmol de morfina. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (CS). CS, μ , κ , MOR e NκM $n=12$, NμM $n=11$. Teste de Fisher. Fonte: Klein (2012).

O tempo em que as mães gastaram lambendo seus filhotes foi menor no grupo NμM em relação ao grupo controle, assim como o tempo que as lactantes agrupavam-nos e também o número de vezes que elas buscaram os neonatos. No entanto, o número de contato com os filhotes não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 25).

Figura 25 – Tempo em que as mães permaneceram lambendo seus filhotes, agrupando-os, número de contatos com os filhotes, e número de buscas aos filhotes realizadas pelas fêmeas no Experimento 2

* $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. Os dados são expressos em média $\pm$ E.P.M. (CS, MOR e NκM $n=12$, NμM $n=11$). Devido à grande variância amostral apresentada entre os grupos, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações grupo a grupo.

Fonte: Klein (2012).

O comportamento materno total (CMT) não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos, no entanto, nenhum dos grupos que receberam injeção de morfina tiveram um animal que realizou CMT (0%). Também não houve diferenças no percentual de realização de Cífose (-) e Cífose (+) (Figura 26).

Figura 26 – Percentual de animais que realizaram cifose (-), cifose (+) e comportamento materno total no Experimento 2

Cifose (-) foi caracterizada quando a mãe realizou cifose sobre 4 ou menos filhotes. Cifose (+) caracterizou-se pela permanência da mãe nessa posição sobre 5 ou mais filhotes. Considerou-se como comportamento materno total (CMT) quando a mãe permaneceu por 3 ou mais minutos consecutivos em cifose (+). Não houve diferenças significantes entre os grupos ($p > 0,05$). CS, MOR e NκM $n=12$, NμM $n=11$. Teste de Fisher. Fonte: Klein (2012).

Para observar se há uma motivação diferencial dos animais nos minutos iniciais de teste (900s) e no tempo total do mesmo (1800s), ou seja, se as fêmeas de cada grupo caçam primeiramente para depois cuidar da prole, ou vice-versa, foi analisado o número de insetos capturados nos primeiros 15 minutos (900s) e no tempo total de teste e o número de filhotes buscados nos 900s iniciais e no tempo total de observação (Tabela 4). O grupo NμM, nos minutos iniciais e no tempo total do teste, capturou menos insetos comparado ao grupo morfina. Quanto ao número de filhotes buscados, nos primeiros 900s o grupo NμM buscou menos neonatos que o grupo controle, e no tempo total de análise, os três grupos que receberam injeção de morfina (MOR, NμM e NκM) buscaram menos filhotes que o grupo controle.

Tabela 4 – Número de baratas capturadas e filhotes buscados nos 15 minutos iniciais (900 s) e no tempo total de teste (1800 s) do Experimento 2

Parâmetro	Grupos			
	CS	MOR	N μ M	NkM
N.º de baratas capturadas até 900 s	2 (0 -5)	4,5 (0 – 5)	0 (0 – 5) ^{\$}	0,5 (0 – 4)
N.º de baratas capturadas (1800 s)	5 (0 -5)	5 (0 – 5)	0 (0 – 5) ^{\$}	1,5 (0 – 5)
N.º de filhotes buscados até 900s	7 (0 -8)	0 (0 – 8)	0 (0 – 6)*	0 (0 – 8)
N.º de filhotes buscados (1800 s)	8 (2 – 8)	0,5 (0 – 8)*	0 (0 – 7)*	0 (0 – 8)*

Dados expressos em mediana (mínimo – máximo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo CS; ^{\$} $p < 0,05$ comparado ao grupo que recebeu injeções de morfina (MOR). CS, MOR e NkM $n=12$, N μ M $n=11$. Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Fonte: Klein (2012).

**“Não há problema que não possa ser
solucionado pela paciência”.**

Chico Xavier

5 DISCUSSÃO

Este estudo visou, por meio de abordagem farmacológica, somar conhecimentos a respeito do papel específico de receptores opióides na porção rostral lateral da substância cinzenta periaquedutal (rPAGl) de fêmeas em lactação, em um paradigma de seleção comportamental entre caçar e cuidar dos filhotes. Nesse contexto, desafios farmacológicos foram feitos sempre agudamente no sítio estudado, ou seja, a rPAGl.

Os diferentes grupos de animais foram submetidos à estimulação específica de receptores μ (grupo μ), κ (grupo κ) e também a uma estimulação opióide menos específica, qual seja, a injeção de morfina (grupo MOR). Em uma segunda fase do estudo, outros dois grupos tratados com morfina tiveram os receptores μ (grupo $N\mu M$) e κ (grupo $N\kappa M$) bloqueados.

É sabido que opióides inibem alguns parâmetros do comportamento materno em ratas (Bridges e Grimm, 1982; Grimm e Bridges, 1983; Mann et al., 1990; Miranda-Paiva et al., 2001; Slamberová et al., 2001). Sukikara et al. (2006) viram um possível papel da substância cinzenta periaquedutal rostro-lateral (rPAGl) na seleção dos comportamentos predatório e maternal, onde mães que recebiam injeções periféricas de morfina deixavam de cuidar de sua prole em predileção à caça. No presente trabalho, as fêmeas que receberam injeções centrais de morfina tiveram um prejuízo nos cuidados com a prole, porém não aparentaram ter tido um melhor desempenho na caça, sugerindo um possível envolvimento de outras áreas do encéfalo no estímulo a caça, e confirmando o importante papel da rPAGl na expressão do comportamento maternal. Uma interpretação alternativa para este resultado é a de que o comportamento predatório já teve sua expressão ótima no grupo controle, não permitindo que efeitos estimulatórios decorrentes de um desafio farmacológico opioidérgico pudessem ser revelados comportamentalmente. Se esse for o caso, a hipótese do tônus opióide endógeno neste sítio neuroanatômico ser capaz de produzir o comportamento predatório ótimo, essa hipótese torna-se relevante. Neste sentido, um estudo anterior do nosso grupo demonstrou que injeções periféricas de um antagonista de receptores opióides, a naloxona, foram capazes de reduzir o número de insetos capturados em ratas lactantes. Esse resultado é consistente com a hipótese levantada acima (Sukikara et al., 2007).

Fêmeas lactantes parecem ser mais eficientes no comportamento predatório que ratas em gestação, e também em relação às ratas virgens (Kinsley e Amory-Meyer, 2011). No que diz respeito ao Experimento 1, não houve diferenças no

presente trabalho entre o número de insetos capturados, o percentual de animais que caçaram, e a latência para captura das baratas também não foi alterada. Consistentemente com as observações prévias, as fêmeas do grupo CS já possuem um bom nível de exibição do comportamento predatório, ou seja, além de cuidar dos filhotes, elas também caçam. Interessantemente, se levarmos em consideração o número de baratas capturadas nos 15 minutos iniciais de teste e no tempo total de teste, e o número de filhotes buscados nesses mesmos intervalos de tempo, as fêmeas do grupo controle parecem primeiro buscar seus filhotes e depois partir para caça, o que não parece ocorrer nos demais grupos, principalmente no grupo MOR.

Moura et al. (2010) observaram que injeções centrais de morfina na rPAGI prejudicaram a busca aos filhotes, a construção de ninho e a exibição do comportamento materno total (CMT). No presente trabalho não foi avaliado o parâmetro de construção do ninho devido ao fato de não haver maravalha na caixa experimental, essencial para que a fêmea construa seu ninho. Acreditamos que esse fato também tenha influenciado o baixo índice de exibição do CMT nos dois experimentos realizados, até mesmo entre as fêmeas do grupo que recebeu injeções de salina (grupo CS - apenas 8,3%). Ao confrontar o comportamento maternal e o predatório da mesma forma que neste estudo, ou seja, sem maravalha na caixa experimental, Sukikara et al. (2007) também encontraram um baixo índice de exibição do comportamento materno total entre os animais do grupo controle (20%).

Outro fator que pode ter afetado a expressão do comportamento materno total, é o fato da curiosidade promovida pela presença de baratas na caixa experimental, sendo que os animais não haviam tido contato com esses insetos anteriormente. As fêmeas demonstravam bastante interesse em explorar a caixa experimental. No caso do grupo CS, as fêmeas agrupavam seus filhotes em um canto da caixa e depois saíam em busca das baratas ou apenas exploravam a caixa. Nos grupos μ e κ , do Experimento 1, este padrão sequencial de comportamentos nem sempre se revelava. Ou seja, as fêmeas agrupavam os filhotes inicialmente, mas também mostravam grande interesse pelo ambiente e algumas caçavam antes de começar a agrupar os filhotes. Já o grupo MOR, que demonstrou passar mais tempo parado, locomoveu-se menos, caracterizado pelo menor número de linhas cruzadas, e realizou auto-limpeza durante menos tempo comparado ao grupo CS. Em sua maioria, ao descobrir que havia insetos na caixa, as fêmeas os caçavam até

os capturarem e após comerem os cinco insetos, elas permaneciam por um período de tempo forrageando a caixa experimental. Após caçarem todos os insetos, seguido de um breve período de exploração da gaiola, elas deitavam-se em um canto da caixa, permanecendo paradas e ignorando os filhotes até o final do teste. Curiosamente, a latência para captura das baratas não se mostrou alterada neste grupo.

O agonista do receptor opióide μ (DAMGO) injetado diretamente na rPAGI não foi capaz de fazer com que as fêmeas apresentassem um padrão de seleção comportamental entre comportamentos maternal e de caça estatisticamente diferenciado em relação ao grupo controle. Mann et al. (1991) ao tratar fêmeas lactantes com o mesmo agonista via i.c.v. viram que a droga é tão potente quanto à morfina ou a β -endorfina para inibir o comportamento materno. Assim, os autores sugerem que a interação dos opióides com o receptor μ é capaz de regular esse comportamento. No presente trabalho, a estimulação dos receptores opióides μ não causou nenhum prejuízo ao comportamento materno, apesar de aparentemente ser o grupo que mais sofreu influência pela dose do agonista, mesmo não havendo diferenças estatísticas. Os animais tratados com o agonista μ não apresentaram uma redução no comportamento exploratório, nem aumento do tempo em que ficaram parados durante o teste. Portanto, pode ser necessária a ativação dos receptores opióides μ de outras áreas que não somente a rPAGI para inibir a expressão do comportamento materno.

Injeções periféricas do agonista opióide κ (U69593) causaram um aumento na latência para busca dos filhotes pelas mães (Teodorov et al., 2008). Quando injetado i.c.v., o agonista κ (U50488) não apresentou efeitos sobre o comportamento materno (Mann et al., 1991). Do mesmo modo, no presente estudo, a injeção local do agonista κ na rPAGI não prejudicou o cuidado com os filhotes. Interessantemente, em ratas pré-tratadas no final da prenhez com morfina, a injeção aguda periférica do agonista κ não foi capaz de diminuir a expressão do comportamento maternal (Teodorov et al., 2008), ilustrando assim a plasticidade do sistema.

A morfina é um agonista de receptores opióides não seletivo, mas age preferencialmente nos receptores do tipo μ (Rang et al., 2007). Esta droga injetada na rPAGI foi capaz de prejudicar consistentemente o comportamento materno. Como os agonistas dos receptores opióides μ e κ não foram capazes de causar qualquer diminuição da expressão do comportamento materno, isso sugere que é necessária

a mobilização de mais de um tipo de receptor opióide na rPAGI para causar qualquer prejuízo ao comportamento materno. Sendo assim, o Experimento 2 foi realizado para tentarmos esclarecer a importância dos receptores μ e κ frente a ação estimulatória da morfina e ainda uma possível influência do tônus endógeno desses receptores no contexto da seleção comportamental.

Nesse trabalho, foi demonstrado pela primeira vez que a injeção na rPAGI de morfina é capaz de promover a diminuição dos cuidados com a prole frente a um ambiente de seleção comportamental, onde o animal tem de fazer a escolha entre cuidar dos filhotes ou caçar.

Buscando entender o possível papel dos receptores opióides μ e κ da rPAGI na seleção comportamental pós-parto, a segunda parte deste estudo testou o efeito agudo de injeções locais de antagonistas destes receptores em animais tratados no minuto seguinte com morfina. Neste cenário, as possíveis alterações comportamentais geradas também podem ser interpretadas como decorrentes do bloqueio do tônus endógeno para os receptores μ e κ . A seguir, discutiremos o significado dos comportamentos observados em animais tratados com morfina que tiveram os receptores μ ou κ previamente bloqueados.

Inicialmente, no que se refere a caça predatória em animais pré-tratados com o antagonista μ opióide (CTAP; grupo $N_{\mu M}$), o número de baratas capturadas foi significativamente reduzido, e consistentemente, o tempo médio para captura dos insetos foi significativamente maior para o segundo e terceiro insetos. Além disso, o percentual de animais que caçaram cada uma das baratas foi menor nesse grupo. Esses resultados combinados, sugerem que o tônus decorrente da estimulação endógena do receptor μ na rPAGI seja relevante para a expressão da caça predatória em ratas lactantes.

Cabe lembrar que na primeira fase deste estudo, tanto o estímulo opióide inespecífico, morfina, como o específico, agonista μ , não foram capazes de alterar o comportamento predatório. Considerando que o bloqueio de receptores κ também não alterou de maneira consistente a expressão da predação, os resultados apontam para uma possível especificidade do tônus opioidérgico endógeno do receptor μ na PAG rostro-lateral no contexto da caça predatória.

A atividade geral de ratos tem sido uma das técnicas de observação direta mais utilizada em estudos de mudanças comportamentais produzidas em animais por alterações fisiológicas, farmacológicas ou outras (Sousa et al., 2006). Assim,

drogas que interferem com a atividade geral, principalmente no que se refere à ambulação, podem tornar difícil a investigação de efeitos mais específicos, ou seja, para uma expressão ótima dos comportamentos maternal e predatório, é preciso que os sistemas de controle motor tenham seu funcionamento adequado. Uma substância que interfira com a motricidade do animal poderia comprometer a expressão de um desses comportamentos, embora não tivesse *per se* um efeito específico (Silva et al., 2001, 2003). No presente estudo, apesar do desafio farmacológico se dar em um locus bem delimitado, cuidados no sentido de controlar essa variável foram tomados e os tempos gastos com exploração da caixa experimental, número de linhas cruzadas, tempo de auto limpeza e o tempo em que o animal permaneceu parado, os quais como um todo espelham a atividade motora, foram medidos e comparados entre os grupos. Em geral, não houve alterações significativas na atividade geral dos animais testados. Entretanto, o tempo parado mostrou-se aumentado em relação ao grupo controle (CS) nos animais tratados com morfina, e também naqueles pré-tratados com antagonistas μ e κ . Assim, com vistas a sondar a hipótese de uma relação causal entre o aumento de tempo que o animal permaneceu parado e o aumento da latência para captura de cada um dos insetos, foram testados o coeficiente de correlação desses dois parâmetros em todos os grupos que receberam injeção de morfina da segunda fase do estudo.

Correlação positiva foi observada apenas para o grupo NkM por ocasião da captura do 1º ($r = 0,60$; $p = 0,038$), 2º ($r = 0,64$; $p = 0,025$), 3º ($r = 0,76$; $p = 0,004$) e 4º ($r = 0,69$; $p = 0,012$) insetos. Apesar da correlação positiva estabelecida para este grupo nestes momentos, a ausência de alteração significativa da latência desse grupo em relação ao controle, não acusa uma interferência relevante de alterações na atividade geral no comportamento predatório. Interessantemente, as latências para captura de cada um dos insetos do grupo N μ M não apresentaram correlação com o tempo de parado em nenhum momento. Assim, é razoável propor que as diferenças observadas no aumento da latência para captura do 2º e 3º insetos nesse grupo, bem como a redução do número total de insetos caçados, sejam específicas para esse comportamento e não consequência de interferências motoras. O menor número de baratas capturadas durante o teste pelo grupo N μ M pode explicar o reduzido tempo gasto comendo-os apresentado por esse grupo.

Diferentemente do ocorrido com a caça predatória, onde o tônus opióide μ parece ser importante para uma expressão ótima do comportamento, a inibição do

comportamento maternal induzida pela morfina se mantém mesmo quando o receptor μ ou o receptor κ são bloqueados. Curiosamente, o bloqueio de receptores μ parece tornar a inibição opioide do comportamento materno induzida por morfina até mais intensa, haja vista a redução significativa no grupo N μ M do tempo gasto com o lambar dos filhotes, o número de vezes em que houve busca dos filhotes, e o tempo que a fêmea gastou agrupando-os. Mann et al. (1990) observaram que a injeção periférica de um antagonista irreversível do receptor opioide μ -1 previamente a injeção de morfina, foi capaz de reverter alguns efeitos inibitórios da morfina sobre o comportamento materno. Nesse sentido, cabe mencionar a complexidade da transmissão opioide, a qual, entre outros fatores, envolve mecanismos de tolerância e sensibilização, possivelmente com vias bioquímicas específicas, formação de homo e heterodímeros e equilíbrio funcional entre eles (Dietis et al., 2011; Waldhoer et al., 2004).

Sendo assim, ainda em relação ao Experimento 2, ao analisarmos os 15 minutos iniciais de teste (900s) e compará-los com o tempo total de teste (1800s), pode-se notar que no grupo N μ M não há uma evidência de um determinado comportamento expressar-se anteriormente a outro de forma consistente. Entretanto isso parece ocorrer com o grupo CS, onde as fêmeas, em sua maioria, primeiramente buscam os filhotes e depois caçam os insetos. No grupo MOR, as ratas preferencialmente capturaram as baratas nos 900s iniciais de análise. Já os animais que tiveram o receptor opioide μ bloqueado, tiveram prejuízo tanto do comportamento predatório, quanto do materno. O grupo N κ M, diferentemente do grupo MOR, não parece ter capturado suas baratas preferencialmente nos minutos iniciais de teste, ainda que o número de insetos capturados por esse grupo não tenha sido diminuído.

Embora neste momento, os resultados não nos permitam especular sobre o papel do tônus opioide para o receptor μ da rPAGI na expressão do comportamento maternal, seu papel nesse cenário parece diferir daquele desempenhado pelo receptor κ . O bloqueio do receptor opioide κ anteriormente a injeção local de morfina, não foi capaz de gerar efeitos diferentes daqueles causados somente pela injeção de morfina, tanto quando nos referimos aos parâmetros predatórios quanto maternos. Sendo assim, esses dados sugerem que a morfina age em mais de um tipo de receptor opioide para causar a inibição do comportamento materno, já que o bloqueio de um deles não foi capaz de reverter

essa inibição. No entanto, o receptor μ parece ter um papel mais relevante na manutenção do estímulo à caça predatória, e possivelmente, também no comportamento materno, já que seu bloqueio foi capaz de acentuar a inibição de alguns parâmetros maternos provocados pela morfina.

Em estudos futuros, a relevância do tônus endógeno para os diversos receptores opióides na rPAGI no contexto da seleção comportamental durante a lactação será testada na ausência da morfina.

O presente trabalho confirma a relevância funcional da transmissão opioidérgica na substância cinzenta periaquedutal rostro-lateral na seleção comportamental do pós-parto no paradigma de caçar versus cuidar dos filhotes e sugere a existência de funções específicas diferenciadas para os receptores μ e κ nesse contexto.

**“Não viva para que a sua presença
seja notada, mas para que a sua falta
seja sentida...”.**

Bob Marley

6 CONCLUSÕES

- A substância cinzenta periaquedutal rostro-lateral (rPAGl) se mostrou uma importante área para a seleção dos comportamentos materno e predatório em ratas no período de lactação.
- Os agonistas dos receptores opióides μ e κ injetados na rPAGl não foram capazes de, sozinhos, alterar os parâmetros de seleção comportamental. Pode ser que seja necessária a ativação de cada um desses tipos de receptores de outras áreas que não somente a rPAGl para que interfira no comportamento materno de ratas.
- Neste trabalho, foi demonstrado pela primeira vez, que a injeção aguda de morfina na rPAGl no paradigma de seleção comportamental é capaz de inibir alguns parâmetros do comportamento materno, preservando os comportamentos predatórios.
- A morfina é capaz de manter a inibição do comportamento materno mesmo na presença de bloqueio de um tipo de receptor opióide (μ ou κ), sugerindo que ela age em mais de um tipo de receptor opióide para causar inibição deste comportamento.
- O receptor opióide μ da rPAGl parece ser importante na manutenção do tônus opioidegico endógeno de estímulo a caça predatória. O bloqueio deste receptor frente à injeção de morfina parece acentuar ainda mais a inibição do comportamento materno pela morfina.
- A ativação farmacológica do receptor opióide κ na rPAGl não é capaz de interferir na seleção comportamental de ratas em lactação.
- O bloqueio do receptor opióide κ na rPAGl não interfere na ação da morfina nesse sítio.

REFERÊNCIAS*

- Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol.* 1995;46(6):575-605.
- Beitz AJ. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience*, 1982;7(1):133-59.
- Blaffer-Hrdy S. Mother nature: maternal instincts and how they shape the human species. Nova Iorque, Ballentine Publishing Group; 1999. p.27-57.
- Bridges RS, Grimm CT. Reversal of morphine disruption of maternal behavior by concurrent treatment with the opiate antagonist naloxone. *Science*, 1982;218(4568):166-8.
- Brownstein MJ. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90(12):5391-3.
- Brunton PJ, Russell JA. The expectant brain: adapting for motherhood. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(1):11-25.
- Byrnes EM, Riger BA, Bridges RS. Opioid receptor antagonism during early lactation results in the increased duration of nursing bouts. *Physiol Behav.* 2000;70(1-2):211-6.
- Comoli E, Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. *Behav Brain Res.* 2003;138(1):17-28.
- Comoli E, Ribeiro-Barbosa ER, Negrão N, Goto M, Canteras NS. Functional mapping of the prosencephalic systems involved in organizing predatory behavior in rats. *Neuroscience*, 2005;130(4):1055-67.
- Cruz AM, Maiorka PC, Canteras NS, Sukikara MH, Felicio LF. Morphine treatment during pregnancy modulates behavioral selection in lactating rats. *Physiol Behav.* 2010;101:40-44.
- Curley JP, Mashoodh R, Champagne FA. Epigenetics and the origins of paternal effects. *Horm Behav.* 2011;59(3):306-14.
- Dietis N, Rowbotham DJ, Lambert DG. Opioid receptor subtypes: fact or artifact? *Br J Anaesth.* 2011;107(1):8-18.
- Felicio LF, Canteras NS. Maternal choices: neural mediation-caring for young or hunting. In: Bridges RS, editor. *Neurobiology of the parental brain.* Amsterdam: Elsevier; 2008. p75-82.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Garvey MJ, Tuason VB, Lumry AE, Hoffmann NG. Occurrence of depression in the postpartum state. *J Affect Disord.* 1983;5(2):97-101.

Grimm CT, Bridges RS. Opiate regulation of maternal behavior in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1983;19(4):609-616.

Gutstein HB, Akil H. Analgésicos Opióides. In: Hardman JG, Limbird LE, (editores). Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 10ªed, Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill; 2005. p427-464.

Hao Y, Huang W, Nielsen DA, Kosten TA. Litter gender composition and sex affect maternal behavior and DNA methylation levels of the *Oprm1* gene in rat offspring. *Front Psychiatry.* 2011;2:21. doi:10.3389/fpsy.2011.00021

Hinde CA, Johnstone RA, Kilner RM. Parent-offspring conflict and coadaptation. *Science*, 2010;327:1373-1376.

Johnson NL, Carini L, Schenk ME, Stewart M, Byrnes EM. Adolescent opiate exposure in the female rat induces subtle alterations in maternal care and transgenerational effects on play behavior. *Front Psychiatry.* 2011; 2:29. doi:10.3389/fpsy.2011.00029

Kinsley CH, Amory-Meyer E. Why the Maternal Brain? *J Neuroendocrinol.* 2011;23(11):974-983.

Kinsley CH, Madonia L, Gifford GW, Tureski K, Griffin GR, Lowry C, Williams J, Collins J, McLearie H, Lambert KG. Motherhood improves learning and memory. *Nature*, 1999;402(6758):137-8.

Kinsley CH. The neuroplastic maternal brain. *Horm Behav.* 2008;54(1):1-4.

Klein MO. Papel dos receptores opióides μ e κ da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na seleção comportamental durante a lactação. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo; 2012. 79p.

Lovick TA, Devall AJ. Progesterone withdrawal-evoked plasticity of neural function in the female periaqueductal grey matter. *Neural Plast.* 2009. doi10.1155/2009/730902

Mann PE, Kinsley CH, Bridges RS. Opioid receptor subtype involvement in maternal behavior in lactating rats. *Neuroendocrinology*, 1991;53(5):487-92.

Mann PE, Pasternak GW, Bridges RS. μ 1 opioid receptor involvement in maternal behavior. *Physiol Behav.* 1990;47(1):133-8.

Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.* 1995;18(1):22-9.

Miranda-Paiva CM, Nasello AG, Yin AJ, Felicio LF. Morphine pretreatment increases opioid inhibitory effects on maternal behavior. *Brain Res Bull.* 2001;55(4):501-5.

Miranda-Paiva CM, Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS, Felicio LF. A role for the periaqueductal grey in the opioidergic inhibition of maternal behavior. *Eur J Neurosci*. 2003;18(3):667-74.

Mota-Ortiz SR, Sukikara MH, Bittencourt JC, Baldo MV, Elias CF, Felicio LF, Canteras NS. The periaqueductal gray as a critical site to mediate reward seeking during predatory hunting. *Behav Brain Res*. 2012; 226(1):32-40.

Mota-Ortiz SR, Sukikara MH, Felicio LF, Canteras NS. Afferent connections to the rostralateral part of the periaqueductal gray: a critical region influencing the motivation drive to hunt and forage. *Neural Plast*. 2009. doi:10.1155/2009/612698

Moura LM, Canteras NS, Sukikara MH, Felicio LF. Morphine infusions into the rostralateral periaqueductal gray affect maternal behaviors. *Braz J Med Biol Res*. 2010;43(9):899-905.

Numan M, Fleming AS, Levy F. Maternal behavior. In: Neil, JD, editor. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. 3rd ed. San Diego: Elsevier; 2006. p1921-1993.

Ottoni EB. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav Res Methods Instrum Comput*. 2000;32(3):446-9.

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

Rang HP, Dale MM, Ritter J, Flower RJ. *Rang & Dale: Farmacologia*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. p588-609.

Ronca AE, Lamkin CA, Alberts JR. Maternal Contributions to Sensory Experience in the Fetal and Newborn Rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol*. 1993;107(1):61-74.

Silva MR, Bernardi MM, Cruz-Casallas PE, Felicio LF. Pimozide injections into the Nucleus accumbens disrupt maternal behaviour in lactating rats. *Pharmacol Toxicol*. 2003;93(1):42-7.

Silva MR, Bernardi MM, Felicio LF. Effects of dopamine receptor antagonists on ongoing maternal behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2001;68(3):461-8.

Simmons D, Self DW. Role of mu- and delta-opioid receptors in the nucleus accumbens in cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34(8):1946-57.

Slamberová R, Szilágyi B, Vathy I. Repeated morphine administration during pregnancy attenuates maternal behavior. *Psychoneuroendocrinology*. 2001;26(6):565-76.

Sobor M, Timár J, Riba P, Friedmann T, Király KP, Gyarmati S, Al-Khrasani M, Fürst S. Effects of opioid agonist and antagonist in dams exposed to morphine during the perinatal period. *Brain Res Bull*. 2011;84(1):53-60.

Sousa N, Almeida OF, Wotjak CT. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes Brain Behav.* 2006;5 Suppl 2: 5-24.

Stern JM, Johnson SK. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. *Physiol Behav.* 1990;47(5):993-1011.

Sukikara MH, Cruz AM, Felipe EC, Anselmo-Franci JA, Canteras NS, de Oliveira CA, Felicio LF. Morphine-induced changes in opioid sensitivity in postpartum females: a unique progesterone response. *J Neuroendocrinol.* 2011;23(11):1134-8.

Sukikara MH, Mota-Ortiz SR, Baldo MV, Felicio LF, Canteras NS. A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. *J Neurosci.* 2006;26(9):2583-2589.

Sukikara MH, Mota-Ortiz SR, Baldo MV, Felicio LF, Canteras NS. The periaqueductal gray and its potential role in maternal behavior inhibition in response to predatory threats. *Behav Brain Res.* 2010;209:226–233.

Sukikara MH, Platero MD, Canteras NS, Felicio LF. Opiate regulation of behavioral selection during lactation. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007;87:315-320.

Teodorov E, Bernardi MM, Ferrari MFR, Fior-Chadi DR, Felicio LF. Plasticity of opioid receptors in the female periaqueductal gray: multiparity-induced increase in the activity of genes encoding for Mu and Kappa receptors and post-translational decrease in delta receptor expression. *J Mol Neurosci.* 2011;43(2):175-81.

Teodorov E, Felicio LF, Bernardi MM. Maternal behavior. In: Andersen ML, Tufik S, organizadores. *Animals models as tools in ethical biomedical research.* São Paulo: UNIFESP; 2010. p149-165.

Teodorov E, Modena CC, Sukikara MH, Felicio LF. Preliminary study of the effects of morphine treatment on opioid receptor gene expression in brain structures of the female rat. *Neuroscience*, 2006;141(3):1225-31.

Teodorov E, Tomita AT, Banon GP, Gil IG, Bernardi MM, Felício LF. Behavioral effects of acute stimulation of kappa-opioid receptors during lactation. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008;90(4):534-9.

Ugarte A, Eguibar JR, Cortés Mdel C, León-Chávez BA, Melo AI. Comparative analysis of maternal care in the high-yawning (HY) and low-yawning (LY) sublines from Sprague-Dawley rats. *Dev Psychobiol.* 2011;53(2):105-17.

Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:953-90.

Zimberknopf E, Xavier GF, Kinsley CH, Felicio LF. Prior parity positively regulates learning and memory in young and middle-aged rats. *Comp Med.* 2011;ç61(4):366-77.