LUCIANA MONTEIRO DE MOURA

**Alteração do comportamento maternal após injeção local de
morfina na PAG rostral lateral de ratas lactantes**

São Paulo

2008

LUCIANA MONTEIRO DE MOURA

**Alteração do comportamento maternal após injeção local de morfina na
PAG rostral lateral de ratas lactantes**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Psicologia da USP para obtenção
do título de Mestre em Psicologia.

Área de Concentração:

Neurociências e Comportamento.

Orientador:

Prof. Dr. Luciano Freitas Felício

São Paulo

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Moura, Luciana Monteiro de.

Alteração do comportamento maternal após injeção local de morfina na pag rostral lateral de ratas lactantes / Luciana Monteiro de Moura; orientador Luciano Freitas Felício. -- São Paulo, 2008.

81 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Comportamento maternal (animal) 2. Morfina 3. Substância cinzenta periaquedutal 4. Amamentação 5. Neuroanatomia I. Título.

QL762

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Luciana Monteiro de Moura

Título: Alteração do comportamento maternal após injeção local de morfina na PAG rostral lateral de ratas lactantes.

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Psicologia, junto ao programa de pós-graduação
Neurociências e Comportamento, no Instituto
de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Titulação/Nome _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Titulação/Nome _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Titulação/Nome _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Aos meus queridos e respeitados
companheiros de experimento,
ratinhas e seus lindos filhotes “salsichinhas”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luciano Freitas Felício que acreditou em mim.

Ao Prof. Dr. Newton Sabino Canteras pelas palavras sábias, na hora certa.

À Dra. Márcia Harumi Sukikara pela paciência e ajuda.

À minha irmã Luzia, sem a qual, talvez, eu não tivesse seguido o caminho da pesquisa, à sua presença e amor. À minha irmã Luciene, cuja força me deu fôlego para agüentar os momentos difíceis. À minha amiga Ro, pelas horas, pela paciência e, sobretudo, pela amizade sincera.

Aos meus pais, por tudo o que puderam me dar.

À Jack, que me ensinou.

Aos amigos que suportaram o mau humor das cirurgias, à Ju pelas palavras doces de bióloga nas manhãs difíceis. À Crê e ao Éder, pela aventura em estatística.

À equipe do laboratório, Sô, Beth, Bel, Adriana, Alines, Amanditas, Luciana, Camila, aos estagiários que por lá passaram, aos técnicos Ivone, Jibóia e Magali. Pessoas que me orientaram, que comigo discutiram, compartilharam enfim. Obrigada pela ajuda nas horas em que não pude estar presente, obrigada pela força pessoal.

Aos funcionários do biotério, técnicos do departamento, guardinhas que compartilharam horas em que ninguém mais estava presente.

À vida, enfim, que seja comemorada em toda singela presença.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

TABELA

LISTA DE ABREVIações

RESUMO

ABSTRACT

CERTIFICADO DE ÉTICA

1. INTRODUÇÃO.....15

1. 1. Comportamento Maternal.....15

1. 2. Caracterização da PAG19

1. 2. 1. PAG e Comportamento19

1. 2. 2. PAG e Comportamento Maternal.....20

1. 2. 3. Organização Neuroanatômica e Funcional da PAG.....21

1. 2. 3. 1. Relações neuroanatômicas da PAG (aferências e eferências).....22

1. 3. Aspectos Farmacológicos.....26

2. OBJETIVOS.....30

2. 1. Objetivo Geral.....30

2. 2. Objetivos Específicos.....30

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3. 1. Animais e manipulação.....	32
3. 2. Cirurgia estereotáxica.....	33
3. 3. Perfusão.....	34
3. 4. Microtomia.....	35
3. 5. Drogas utilizadas.....	35
3. 6. Delineamento experimental da análise de comportamento.....	36
3. 7. Parâmetros comportamentais maternos analisados.....	38
3. 8. Análise Estatística.....	41
4. RESULTADOS.....	43
4. 1. Busca e agrupamento.....	43
4. 2. Construção de ninho.....	45
4. 3. Cifose e <i>Nursing</i>	46
4. 4. <i>Grooming</i> de Filhotes e <i>Self Grooming</i>	47
4. 5. Forrageamento.....	48
4. 6. Comportamento materno total (CMT).....	49
4. 7. Localização das injeções na rPAGl.....	51
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
n.	
1	Esquema experimental de cirurgia estereotáxica e injeção aguda para análise do comportamento maternal..... 37
2	Esquema experimental da análise do comportamento maternal no 6º dia de lactação..... 37
3	Comportamento de busca e agrupamento dos 8 filhotes, percentual de ratas que realizaram agrupamento..... 43
4	Comportamento de busca e agrupamento, tempo total despendido para agrupamento dos 8 filhotes, média das latências por meio de escores..... 44
5	Comportamento de construção de ninho, percentual de ratas que realizaram a construção..... 45
6	Comportamento de construção de ninho, latência para a construção, média das latências por meio de escores..... 46
7	Comportamento de cifo sobre os 8 filhotes, percentual de ratas que realizaram agrupamento..... 47
8	Comportamento de <i>grooming</i> de filhotes, latência para a ocorrência do comportamento, média das latências por meio de escores..... 48
9	Latência para a ocorrência do comportamento de forrageamento, média das latências..... 49
10	Comportamento Materno Total, percentual de ratas que realizaram CMT..... 50
11	Comportamento Materno Total, latência para a ocorrência do comportamento, média das latências por meio de escores..... 51
12	Diagramas mostrando os principais locais de injeção de morfina..... 51

TABELA

1	Intervalos de tempo para os escores adotados.....	41
---	---	----

.

LISTA DE ABREVIações *

AHN - núcleo hipotalâmico anterior

Bla - núcleo basolateral da amígdala

CCK - colecistocinina

CM - comportamento maternal

CMT - comportamento materno total

DMH - hipotálamo dorsomedial

LAAH - área lateral do hipotálamo anterior

LCN - núcleo lateral cervical

LS - septo lateral

mPFC - córtex medial pré-frontal

MPN - núcleo medial pré-óptico

MPOA - área pré-óptica medial

PAG - substância cinzenta periaquedutal

PAG l, dl, d, dm, v, vl - substância cinzenta periaquedutal lateral, dorso-lateral, dorsal, dorso-medial, ventral, ventro-lateral respectivamente

PFC - córtex pré-frontal

POA - área pré-óptica

r, cPAG - substância cinzenta periaquedutal rostral e caudal respectivamente

RVM - bulbo rostral ventromedial

RVLM - bulbo rostral ventrolateral

VMH - hipotálamo ventro-medial

* Siglas dos termos anatómicos mantidas em inglês, os quais seguiram a tradução para a língua portuguesa de acordo com Martin, 1998.

RESUMO

MOURA, L. M. **Alteração do comportamento maternal após injeção local de morfina na PAG rostral lateral de ratas lactantes**. São Paulo, 2008. 81p. Dissertação de Mestrado para Exame de Defesa. Neurociências e Comportamento, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.

Em estudos anteriores do laboratório, mediante paradigma farmacológico de injeção sistêmica de morfina, foi examinada a influência dos opióides no desempenho do comportamento maternal em ratas. Foi verificado que injeções centrais de naloxona e de CCK na PAG rostral lateral (rPAGl) reverteram a inibição opioidérgica desse comportamento. Dando continuidade ao estudo da ação da PAG no comportamento maternal, foi proposto investigar neste trabalho possíveis alterações dele por meio da administração local de morfina na rPAGl de ratas lactantes. Esse tem se mostrado um paradigma eficiente e capaz de fornecer pistas do arcabouço farmacológico e neurofisiológico que integram a intrincada rede neuroanatômica que o permeia. Assim, por meio de um método adequado como a estereotaxia, é possível avaliar em termos neuroanatômicos, de modo mais isolado e eficiente, a interação da PAG nesse comportamento. As ratas lactantes, da linhagem Wistar, que receberam injeções centrais de morfina apresentaram diferenças estatisticamente significantes nos parâmetros de pré-nutrição do comportamento maternal. A busca e agrupamento e a construção de ninho foram interrompidos por meio do tratamento opióide. Com esse mesmo tratamento, foi verificado também a alteração da latência, estatisticamente significativa, nos parâmetros de forrageamento e de *grooming* de filhotes. Dessa maneira, o comportamento materno total (CMT) mostrou-se inibido nas ratas tratadas com morfina. Tais resultados são interpretados como ação da rPAGl na modulação da decisão do comportamento, a qual é decorrente de interações neuroanatômicas com outros sítios cerebrais. Portanto, os dados sugerem que a rPAGl interfere em parâmetros comportamentais relacionados ao início ou ao estabelecimento do comportamento maternal, mas não afeta comportamentos reflexos de nutrição dos filhotes como a cifose.

Palavras-chave: Comportamento maternal, Opióides, Substância Cinzenta Periaquedutal, Lactação, Neuroanatomia.

ABSTRACT

MOURA, L. M. **Maternal behavior disruption through morphine infusion in rostral lateral PAG of lactating rats. [Alteração do comportamento maternal após injeção local de morfina na PAG rostral lateral de ratas lactantes]**. São Paulo, 2008. 81p. Dissertation (Master's degree) – Post Graduation Program in Neuroscience and Behavior, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.

By using pharmacological approaches such as systemic injections of morphine, it has been possible to reveal the inhibitory influence of opioids on rat maternal behavior (MB). Also, it has been reported that central infusions of naloxone or CCK into the rostral lateral PAG restore maternal behavior in lactating rats treated with morphine. This research investigates possible interferences of morphine in MB, through central infusions of this drug in rPAGl of lactating rats. This is an efficient paradigm to provide pharmacological and neurophysiological cues in the functional neuroanatomy of maternal behavior. Stereotaxical procedures were used to place cannulas directed to the PAG area, inject morphine into the PAG and evaluate its behavioral effects. Lactating Wistar rats received central infusions of morphine and showed significant differences in the various parameters. Retrieval and nest building were disrupted. This treatment alters latencies of foraging and pup grooming as well. Thus, full maternal behavior (FMB) was inhibited in the opioidergic treatment. The results suggest an involvement of a PAG role in opioidergic-modulation in maternal behavior. This modulation is provided for rPAGl, which have many neuroanatomical relations with another brain sites. These data suggest a role for rPAGl in ongoing of maternal behavior, but not in reflex nurturance behaviors like kyphosis.

Key-words: Maternal behavior, Opioids, Periaqueductal Gray, Lactation, Neuroanatomy.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Comportamento maternal após injeção local de morfina na PAG lateral de ratas lactantes", protocolado sob o nº1130/2007, utilizando 100 (cem) ratos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/08/07.

(We certify that the Research "Maternal behavior of lactating rats through infusion of morphine in rostral lateral PAG", protocol number 1130/2007, utilizing 100 (one hundred) rats, under the responsibility Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/22/07.

São Paulo, 22 de agosto de 2007

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

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Comportamento Maternal

O comportamento maternal (CM) é composto por uma série de comportamentos que, em conjunto, podem promover a manutenção da vida da prole ou de parte dela a fim de que atinja a idade reprodutiva, quando poderá dar continuidade ao ciclo da vida.

Esse comportamento vem sendo estudado em animais, principalmente em mamíferos, classe na qual os filhotes dependem exclusivamente do leite, do aquecimento, da proteção, da defesa e da instrução maternos para sua independência. Tal comportamento, intrigante devido à sua complexidade, é ainda mais flexível em humanos, mas, também, pode ser verificado em modelo animal, como em ratos (STERN, 1997).

Sabe-se que o cuidado maternal é resultado de uma série de fatores fisiológicos, permeados por substratos neuroanatômicos que constituem uma rede intrincada, da qual partes já foram elucidadas.

Portanto, este trabalho tem o objetivo de contribuir para o conhecimento de parte dessa rede relacionada ao comportamento maternal, em modelo animal, no caso, ratas lactantes. O qual utilizar-se-á de informações sobre substrato neuroanatômico-funcional (focado na rPAGl – substância cinzenta periaquedutal rostral lateral) com paradigma experimental farmacológico comportamental, por meio de administração central de morfina.

Como regra, o comportamento maternal, em ratas Wistar, *Rattus norvegicus*, ocorre por meio de um contato intenso nos primeiros dias de vida da ninhada, diminuindo progressivamente conforme aumenta a autonomia dos filhotes, cujo desmame pode ocorrer com cerca de 21 dias. Os filhotes, nesses primeiros dias, são desprovidos de pêlos, incapazes de se locomover e de manter sua própria temperatura (GUBERNICK; KLOPFER, 1981 *apud* MIRANDA-PAIVA, 2003) e são, também, incapazes de enxergar por causa dos olhos fechados, que só se abrem por volta do 10º dia de idade. A mãe, portanto, é integral provedora nesse período.

É nesse contexto que as ratas lactantes desenvolvem uma série de estratégias de cuidado maternal direto ou indireto. NUMAN (1994) aponta comportamentos anteriores ao próprio parto que objetivam a preparação para os cuidados da ninhada, tais como: lamber a própria região mamária a fim de auxiliar no desenvolvimento das glândulas e a hiperfagia. Para o desenvolvimento dessas estratégias, aspectos hormonais, neurais e ambientais estão envolvidos no estabelecimento do comportamento maternal.

Mudanças hormonais estão associadas à preparação pré-parto e pós-parto, e estudos sugerem que alterações nos níveis de estrógeno, prolactina e progesterona estão entre os fatores que estimulam o comportamento maternal em ratas (NUMAN, 1994). Foi demonstrado que altos níveis de progesterona durante a prenhez inibem o CM, os quais precisam decair ao final dela, enquanto níveis de estrógeno (BRIDGES, 1984 *apud* MANN

et al., 1995) e de prolactina (NUMAN, 1994) aumentam para o rápido estabelecimento desse comportamento.

Na lactação, as ratas são estimuladas pelo contato físico com a prole, que pode, por exemplo, determinar a ocorrência de um comportamento maternal direto, como a posição de cifose que permite a amamentação. STERN *et al.* (2002) observaram que o ato de mamar regula o reflexo de ejeção do leite nas mães, por meio da liberação de hormônios como a ocitocina. E propõem algumas modificações nas vias neuroanatômico-funcionais que regulam esses fenômenos, bem como no comportamento de cifose, envolvendo as colunas dorsolaterais da medula espinhal e a PAG.

Todos os comportamentos maternos motores ativos em ratas compartilham um componente crítico oral (STERN, 1997), e há prováveis diferenças devidas aos hormônios ovarianos que aumentam a sensibilidade da região perioral (LONSTEIN *et al.*, 1999).

Os comportamentos diretos observáveis voltados à prole são: a busca e o agrupamento, o *nursing* que consiste em permanecer sobre os filhotes, aquecendo-os e amamentando-os (MIRANDA-PAIVA, 2003), a cifose que compõe o *nursing* mais ativo e é uma posição que ajuda na amamentação, a qual, segundo LONSTEIN; STERN (1997a) pode apresentar variações. Durante o *nursing*, é comum ocorrer o *grooming* de filhotes que consiste no ato de cheirá-los e de lambê-los (*licking*), o que para NUMAN (1994) estimula a micção e a defecação neles.

Os comportamentos indiretos voltados à prole seriam caracterizados pela construção de ninho, local que promove área segura na ausência da mãe e onde normalmente se desenvolve o *nursing*, e, também, pela agressividade contra intrusos (NUMAN, 1994). Há, portanto, um período ativo que precede a quiescência caracterizada pelo *nursing* (LONSTEIN *et al.*, 1998), esse último chega a ocupar cerca de 80% do período do tempo das ratas nos primeiros dias do pós-parto, o qual decai gradualmente, podendo atingir, apenas, cerca de 25% do tempo na segunda semana (GROTA; ADER, 1969, 1974 *apud* STERN, 1997).

Muitas áreas cerebrais relacionadas ao controle do CM têm sido descritas na literatura, sobretudo, a pré-óptica (POA). A área pré-óptica medial (MPOA) envia robusta projeção para a PAG (BEHBEHANI, 1995) e, NUMAN (1994) considera que aquelas áreas inervadas pelas eferências laterais da área pré-óptica medial, como a **substância cinzenta periaquedutal (PAG)**, também desempenham importante papel nesse comportamento e, devem, portanto, constituir relevante fonte de pesquisa para a determinação dessas interações.

1. 2. Caracterização da PAG

1. 2. 1. PAG e Comportamento

A PAG, área que cerca o aqueduto ventricular no mesencéfalo, possui neurônios que são parte do circuito para a supressão da dor endógena e a ela é atribuída modulação afetiva da dor (MARTIN, 1998). A PAG vem sendo amplamente estudada em virtude da relação dessa modulação, no entanto, não pode ser caracterizada como área exclusiva dessa função.

Além da antinocicepção citada por inúmeros autores, há muitos outros processos relacionados a PAG como: o medo e a ansiedade (BEHBEHANI, 1995), a regulação autonômica (BEHBEHANI, 1995; SEMENENKO; LUMB, 1999), a vocalização (BEHBEHANI, 1995), o comportamento de defesa (VIANNA; BRANDÃO, 2003) ativa ou quiescente (KEAY *et al.*, 1997; SEMENENKO; LUMB, 1999; MOUTON *et al.*, 2001; KEAY; BANDLER, 2001), a luta ou a fuga (PAREDES *et al.*, 2000), a geração e elaboração de resposta de defesa de medo evocado (BORELLI *et al.*, 2004), o comportamento de caça predatória (COMOLI *et al.*, 2003; SUKIKARA *et al.*, 2006), o comportamento aversivo (SEMENENKO; LUMB, 1999), o comportamento de acasalamento e receptividade sexual (LONSTEIN; STERN, 1997a; MARSON; FOLEY, 2004; KLOP *et al.*, 2005), o controle da micção (KLOP *et al.*, 2005) a

lordose sexual (LONSTEIN; STERN, 1998, 1999; MARSON; FOLEY, 2004), e o gerenciamento de estratégias ativas (SEMENENKO; LUMB, 1999; KEAY; BANDLER, 2001).

Mais recentemente, a PAGI foi relacionada a seleção de respostas comportamentais adaptativas, promovendo a comutação entre os comportamentos maternal e alimentar de caça predatória (SUKIKARA *et al.*, 2006) bem como, a ativação seletiva mediante interação co-específica, proporcionando a comutação do comportamento maternal para a hipervigilância e aumento da locomoção, refletindo na agressão maternal contra macho intruso (PAVESI *et al.*, 2007).

1. 2. 2. PAG e Comportamento Maternal

MIRANDA-PAIVA (2003), em seu estudo, examinou as relações colecistocinina-opioides no controle do comportamento maternal, observando que a região da PAG desempenha um importante papel nesse comportamento. Outros autores têm relacionado a PAG não somente ao comportamento maternal (LONSTEIN; STERN, 1997a; STERN, 1997; LONSTEIN; DE VRIES, 2000), mas, também, a componentes desse, como a agressividade contra machos intrusos durante a lactação (LONSTEIN; STERN, 1997a, 1998; PAVESI *et al.*, 2007) e a cifose maternal (LONSTEIN; STERN, 1997a, 1997b, 1998, 1999; LONSTEIN; DE VRIES, 2000).

1. 2. 3. Organização neuroanatômica e funcional da PAG

Muito se tem pesquisado sobre as relações neuroanatômicas da PAG, vários trabalhos realizaram o delineamento dessa região por meio de traçadores retrógrados e anterógrados, no entanto, há ainda inúmeras questões a serem respondidas. O que é bastante representativo nos estudos é o fato de que as conexões entre PAG e outras estruturas do sistema nervoso não são homogêneas, sugerindo uma especialização regional (VIANNA; BRANDÃO, 2003), que constituem circuitos colunares longitudinais (KEAY *et al.*, 1997). Esses dados neuroanatômicos são relevantes para a compreensão do papel funcional desempenhado pela PAG.

Subdivisões da PAG seriam, portanto, responsáveis por diferentes influências no estabelecimento e desenvolvimento de variados comportamentos, devido à sua organização topográfica (VIANNA; BRANDÃO, 2003; KEAY *et al.*, 1997, MOUTON *et al.*, 2004), a qual recebe projeções de inúmeras regiões do sistema nervoso central e também envia projeções para outras regiões desse sistema, tanto em níveis superiores quanto inferiores.

MOUNTON *et al.* (2001) observam que em gatos neurônios de projeção espinhais provenientes da lâmina I para PAG, especificamente para a PAGI (KEAY *et al.*, 2001), constituem uma via importante de nocicepção. E que muitas outras células seriam responsáveis por outros tipos de informação, além dessa, como o comportamento de

acasalamento, e haveria outras possibilidades ainda não conhecidas, nas quais a PAG imprimiria seu forte controle sobre o comportamento emocional.

A seguir, há um breve levantamento sobre algumas das relações neuroanatômico-funcionais da PAG, principalmente, para a PAG lateral, a qual segundo BEHBEHANI (1995) se origina na mais caudal PAG e se estende ao nível médio rostro-caudal. Para efeito de estudo, neste trabalho utilizou-se coordenadas do atlas PAXINOS; WATSON (1986) que consideram a PAG lateral rostral no nível do núcleo do nervo oculomotor e/ou do núcleo Edinger-Westphal.

1. 2. 3. 1. Relações neuroanatômicas da PAG (aferências e eferências)

A PAG recebe aferências de um grande número de áreas cerebrais límbicas como córtex insular e amígdala, assim como das estruturas sensoriais e autonômicas da medula espinhal e do tronco cerebral. A mais intensa projeção para a PAG provém do hipotálamo, de muitos núcleos, incluindo MPOA. Essas aferências hipotalâmicas terminam em subregiões da PAG, ou seja, estão topograficamente organizadas (BEHBEHANI, 1995).

McGARAUGHTY *et al.* (2004) apontam a PAG como o relé integrativo entre as aferências da amígdala (Bla – núcleo basolateral da amígdala e Mea – núcleo medial da amígdala) e RMV (bulbo rostral ventromedial) ↔ corno dorsal na medula espinhal. Para

PAVESI *et al.* (2007) a amígdala desempenha algum papel na modulação do comportamento maternal.

TSUKAHARA; YAMANOUCHI (2001) por meio de traçador retrógrado encontraram muitos corpos celulares do septo lateral (LS) em POA (incluindo MPOA e MPN), o que indica que neurônios localizados nesses núcleos também projetam fibras para a PAG ipsilateralmente e, muitas conexões entre POA e PAG já foram reportadas. O mesmo estudo informa, que já foram encontradas células marcadas em VMH (hipotálamo ventro-medial), quando traçador retrógrado foi injetado na PAG.

A investigação dos reflexos genitais em fêmeas demonstra que aferências da MPOA (área pré-óptica medial) têm entre os principais alvos a PAG. O estudo confirma que há densas projeções de MPOA que atravessam PAG_{l,vi} (MARSON; FOLEY, 2004).

Projeções provenientes da área lateral do hipotálamo anterior (LAAH) atingem mais significativamente a PAG caudal lateral que qualquer outra subdivisão (SEMENENKO; LUMB, 1999; KEAY; BANDLER, 2001). Já, o núcleo hipotalâmico anterior (AHN) exibe relação recíproca com a PAG_l, mas há poucas conexões se comparadas às várias aferências do hipotálamo que a PAG_{dl} recebe (VIANNA; BRANDÃO, 2003).

FONTES *et al.* (2006) apontam aferências do hipotálamo dorsomedial (DMH) atingindo a PAG lateral e dorsolateral, sendo que a ativação dessas regiões teria efeitos semelhantes àqueles observados na ativação dos neurônios do DMH, ou seja, a PAG funcionaria neste caso como um relé para um estímulo aversivo, o qual teria

anteriormente aferentado a amígdala e, atuaria diretamente sobre vias motoras que produziriam alterações comportamentais e, indiretamente sobre a o pálido da Rafe e no RVML.

Tanto regiões da PAG quanto hipotalâmicas partilham projeções também topograficamente organizadas provenientes das mesmas áreas do córtex pré-frontal (PFC) e se conectam entre elas mesmas. Isso caracteriza um circuito neuronal PFC-hipotalâmico-PAG que regula diferentes estratégias de reação comportamental. Descobertas recentes indicam que as conexões PFC-PAG e PFC-hipotálamo são organizadas em ratos de maneira similar à dos primatas (KEAY; BANDLER, 2001).

O córtex correspondente às áreas motoras primárias das patas dianteiras, das patas traseiras e do tronco, projeta exclusivamente para a PAG_{l,vi} (VIANNA; BRANDÃO, 2003). Em coelhos, seguindo os depósitos realizados na PAG lateral, foram observadas células retrogradamente marcadas nas três subdivisões do mPFC (córtex pré-frontal medial) (PAREDES *et al.*, 2000).

Quanto as aferências de níveis inferiores, nem PAG_{dm} (dorso medial) nem PAG_{dl} (dorso lateral) recebem projeções diretas espinhais como a PAG lateral. Assim, a manipulação de dor cutânea evoca aumento da expressão de Fos predominantemente na PAG lateral (KEAY *et al.*, 1997). MOUTON *et al.* (2004) citam que projeções neuroanatômicas topograficamente organizadas via PAG estariam envolvidas num

sistema de alerta, visto que ela organiza comportamentos básicos de sobrevivência, e, somente, neurônios localizados nos dois terços laterais do LCN atingem a PAG lateral.

Ainda restam várias dúvidas sobre as projeções que a PAG envia para outros sítios cerebrais ou inferiores no sistema nervoso central, sendo que algumas delas foram mais profundamente estudadas.

Há projeções que passam por relés ao nível do núcleo cuneiforme e caudal da Rafe (cujas aferências provêm, principalmente das PAGdm e PAGl), atingindo os motoneurônios do corno ventral da espinha dorsal. Há, também, projeções da PAG que terminam no tálamo, predominantemente provenientes da PAGl e PAGvl. Essas projeções inervariam o núcleo talâmico intralaminar e medial e, ainda, aguardariam confirmação (VIANNA; BRANDÃO, 2003). Em trabalho recente, MOTA-ORTIZ *et al.*, 2007, verificaram que fibras ascendentes da rPAGl provêm um *input* robusto para área hipotalâmica lateral e numa menor extensão para o núcleo talâmico intralaminar.

Tanto a PAGdm quanto a PAGl são as duas regiões menos conhecidas. Mas, em termos funcionais, a estimulação da PAG lateral e dorsal provoca vigorosas reações motoras similares àsquelas induzidas por estímulos de choques nas patas (VIANNA; BRANDÃO, 2003). Já a inibição de PAGl e PAGdl em ratos acordados reduz a frequência cardíaca e a pressão arterial, envolvendo a via DMH – PAG – RVLM, no qual há neurônios pré-motores simpáticos, que também recebe projeções diretas da PAGl (FONTES *et al.*, 2006).

Principalmente as relações neuroanatômicas da rPAGI com o hipotálamo constituam material relevante que possa vir a elucidar a rede que integra e interfere no comportamento maternal.

1. 3. Aspectos farmacológicos

O ópio, uma substância extraída da planta *Papaver somniferum*, tem como principal ingrediente ativo, a morfina, substância usada amplamente na medicina na forma de um sal, sob o nome genérico de sulfato de morfina, para supressão da dor ou, ainda, como droga de abuso por dependentes. A morfina tem efeito bifásico na atividade espontânea, em baixas doses, aumenta a movimentação e a decresce em altas doses. Muitas drogas sintéticas atuam como antagonistas de opióides, tal como o antagonista puro, naloxona (MCKIM, 2003). A ação da morfina na PAG é amplamente explorada na literatura, porque essa área tem sido bastante estudada na modulação da dor.

Trabalhos realizados com injeção local de morfina na PAG caracterizam-na como área suscetível à ação dessa droga (YAKSH *et al.*, 1976), a qual atua na inibição da nocicepção por intermédio da modulação GABAérgica pela PAG via fibras descendentes e sua interação na medula (DEPAULIS *et al.*, 1987). Há, de fato, decréscimo nos níveis extracelulares de GABA (STILLER *et al.*, 1996). A analgesia promovida pela morfina é revertida pelo antagonista naloxona quando aplicada nessa área (BEHBEHANI, 1995). Mas características da antinocicepção diferem entre a PAG lateral/dorsal e ventrolateral,

por causa dos diferentes *outputs* gerados por essas áreas (TORTORICI; MORGAN, 2002). Segundo TORTORICI *et al.* (2003) a PAGvl estaria relacionada ao mecanismo de tolerância à morfina, o qual pode ser prevenido ou revertido por CCK.

Os opióides são substâncias potentes que podem atuar na inibição da nocicepção, mas, também, dependendo da dose, atuam na supressão do comportamento maternal (MIRANDA-PAIVA *et al.*, 2001).

RUBIN; BRIDGES (1984) afirmam que injeção local de sulfato de morfina na área pré-óptica (POA) reduz o comportamento maternal, efeito que pode ser receptor-mediado. KINSLEY *et al.* (1995) concordando com outros autores, citam a clara influência inibitória da morfina no CM, a qual injetada intracerebroventricular (ICV) e na POA exerce influência aversiva no desenvolvimento desse comportamento em relação aos filhotes. Segundo WELLMAN *et al.* (1997) a alteração no cuidado parental pode ser revertida mediante utilização da naloxona.

As β -endorfinas atuam como opióides endógenos e tem seus efeitos revertidos por CCK (MANN *et al.*, 1995), a qual pode agir como um antagonista endógeno de opióide (BEHBEHANI, 1995; MIRANDA-PAIVA; FELÍCIO, 1999), inclusive na manutenção do comportamento maternal (FELÍCIO *et al.*, 1991).

Por meio da dosagem de enzima GAD determinou-se a ação dos neurônios GABAérgicos, os quais, na cPAGvl, podem proporcionar o mecanismo inibitório necessário para o correto desempenho dos cuidados maternos. Na cPAGvl foi observado um aumento

de Fos, indicando que essa área pode ser particularmente responsiva às pistas sensoriais fornecidas pelos filhotes (LONSTEIN; VRIES, 2000).

MIRANDA-PAIVA *et al.* (2003) verificaram que níveis críticos de morfina, injetada por via subcutânea, induzem a ativação da PAG rostral lateral, área que parece atuar inibição do comportamento maternal em ratas lactantes. Essa hipótese foi corroborada porque injeções de naloxona na PAG rostral bloquearam a influência opiodérgica, mas o mesmo não foi observado quando as injeções ocorreram no núcleo reticular mesencefálico.

Lesões bilaterais na rPAGI restituem o comportamento maternal, antes interrompido por busca alimentar motivada pela ação da morfina injetada perifericamente (SUKIKARA *et al.*, 2006).

Resulta claro, então, que neuroanatomicamente a PAG possui subdivisões que podem atuar em diferentes comportamentos. A PAG rostral lateral tem se revelado pelos últimos trabalhos de pesquisa como uma região que pode estar envolvida no comportamento maternal e, portanto, ela constitui a área de estudo deste trabalho.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2. 1. Objetivo Geral

Os conhecimentos sobre a influência de drogas de abuso como a morfina, elucidaram, em parte, o envolvimento e a interação farmacológica de alguns dos sítios cerebrais relacionados ao comportamento maternal. No entanto, a expressão desse comportamento em ratas e sua relação com a PAG rostral lateral ainda é uma questão. Portanto, este trabalho tem por objetivo avaliar a interação opioide envolvendo a PAG de ratas na expressão do comportamento maternal.

2. 2. Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito da injeção central aguda de morfina na PAG rostral lateral no comportamento de ratas lactantes, verificando se o comportamento maternal é inibido ou afetado e conseqüentemente se essa região está relacionada a esse comportamento;
2. Avaliar os parâmetros comportamentais maternos distintamente, a fim de se determinar se há maior ou menor interferência em cada parâmetro;

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. 1. Animais e manipulação

Para este trabalho foram acasaladas 85 fêmeas nulíparas de *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, pesando de 180 a 220g, entre 80 e 90 dias de idade no início dos experimentos. Essas fêmeas foram cedidas pelo biotério do Departamento de Patologia da Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) e foram utilizadas de acordo com as normas e procedimentos relativos ao uso de animais de experimentação do mesmo departamento, baseadas naquelas descritas pelo *Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources National Research Council, USA*. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (processo nº 1130/2007). Todos os esforços foram feitos para reduzir o sofrimento e o número de animais utilizados.

Cada duas fêmeas foram mantidas com um macho experiente a partir de 17h e no dia seguinte, entre 8 e 9h, foi realizado o lavado vaginal, o procedimento foi repetido até se detectar a presença de espermatozóides na análise citológica, o que foi considerado o dia 1 de prenhez.

Quando detectada a prenhez, a fêmea foi separada em gaiola individual de polipropileno medindo 41 X 34 X 16 cm, com uma camada de maravalha de aproximadamente 3cm, em salas com sistema de ventilação (21-25°C) e ciclo de luz de 12h (06h – 18h). Água e comida foram fornecidas *ad libitum* durante os procedimentos experimentais, exceto no período de realização do experimento de comportamento.

Diariamente, até 14h, os nascimentos foram checados e se verificado o nascimento, o dia do parto foi considerado dia 0 de lactação. No dia 1 de lactação, cada ninhada foi padronizada, por meio de sexagem, em 4 fêmeas e 4 machos.

3. 2. Cirurgia estereotáxica

As fêmeas foram anestesiadas entre os dias 14 e 16 de prenhez, via intraperitoneal, com uma mistura de quetamina e xilazina e, colocadas em um equipamento estereotáxico (*Kopf Instrument – Model 900*, Tujunga, CA, USA). Num lado do cérebro foi implantada uma cânula guia unilateralmente (*Plastics One Inc.[®]*, Roanoke, VI, USA) na PAG rostral lateral. As medidas para realização da cirurgia foram tomadas com base no bregma sobre a linha média na região rostral da calota craniana. Uma vez tomada essa medida, foi definida a localização da cânula utilizando-se as seguintes coordenadas: AP = -6,8mm do bregma; ML = 0,6mm ; DV

= 5,3mm, segundo atlas PAXINOS E WATSON (1986) e acertos de coordenadas foram realizados previamente.

Por meio de broca odontológica foram realizadas 3 aberturas na calota craniana, uma profunda para a introdução da cânula guia e outras duas superficiais para ancorar dois parafusos de sustentação. Cânula e parafusos foram fixados com o auxílio de resina acrílica odontológica (polímero metil metacrilato – ORTO CLASS®). Ao término da cirurgia, as ratas foram suturadas e foi aplicada pomada antibiótica à base de neomicina e bacitracina. As ratas foram mantidas em local aquecido até se recuperarem da anestesia.

3. 3. Perfusão

Após o registro do comportamento maternal, as ratas foram profundamente anestesiadas (com uma mistura de quetamina e xilazina) e, perfundidas por meio de uma cânula intracardíaca ligada a uma bomba peristáltica (Cole Parmer® – Master Flex L/S Model 7016-20). Foi utilizada solução salina 0,9 % em temperatura ambiente (100 ml) seguida por solução de formaldeído 10% (600ml) a 4° C.

Após a perfusão, os cérebros foram removidos de seus invólucros ósseos e colocados em uma solução de sacarose a 20% em formaldeído 10%, na qual foram mantidos a 4° C até o dia seguinte.

3. 4. Microtomia

Os cérebros sofreram cortes seriados coronais, em micrótomo de congelação (*Reicher-Young*), com espessura de 30 µm. Os cortes foram conservados em solução azida e posteriormente montados em lâminas, as quais foram tratadas com tionina (método *Nissl*), a fim de observar, ao microscópio, a correta localização da cânula (segundo o atlas PAXINOS; WATSON, 1986).

3. 5. Drogas Utilizadas

- SULFATO DE MORFINA: concentração 10mg/ml; peso molecular: 320,84 (Dimorf® - Laboratório Cristália S/A, São Paulo - SP);
- CLORIDRATO DE XILAZINA: concentração 20mg/ml - Kensol® - Laboratórios König S/A;
- CLORIDRATO DE QUETAMINA: concentração 50mg/ml - Vetanarcol® - Laboratórios König S/A;

3. 6. Delineamento experimental da análise de comportamento

No sexto dia de lactação (considerado dia 0, o próprio dia do nascimento), os filhotes, água e alimento foram removidos da gaiola moradia e as fêmeas foram habituadas na sala experimental durante 30 min; em seguida, as fêmeas receberam uma injeção local, via cânula guia, por meio de uma seringa Hamilton[®] acoplada a uma bomba (*Harvard Apparatus Model*[®] 11 55-1199), de 0,6 µl de solução salina 0,9% ou 6 µg (6µg/0,6µl) de sulfato de morfina. Os volumes foram microinjetados em animais diferentes por um período de 30s e permaneceu por um período de 30s pós-injeção como adotado nos experimentos de DEPAULIS *et al.* (1987); RUBIN; BRIDGES (1984).

Trinta minutos depois da injeção, os 8 filhotes foram repostos aleatoriamente na gaiola moradia, exceto no ninho (previamente destruídos), e os parâmetros de comportamento maternal foram avaliados.

Ao final dos testes de comportamento maternal, os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos, segundo a descrição do item 3.3.

Figura 1 - Esquema experimental de cirurgia estereotáxica e injeção aguda para análise do comportamento maternal.

Figura 2 – Esquema experimental da análise do comportamento maternal no 6º dia de lactação.

3. 7. Parâmetros comportamentais maternos analisados

Após 30 minutos de injeção, os parâmetros comportamentais (listados abaixo) foram observados e registrados, quando os 8 filhotes foram devolvidos à caixa moradia. As observações ocorreram ininterruptamente durante 30 minutos, seguidas de observações pontuais aos 45 e 60 minutos do experimento.

Busca e agrupamento

Entende-se busca e agrupamento por “agrupar os 8 filhotes”.

- ▶ Realização de agrupamento;
- ▶ Latência para busca do primeiro filhote;
- ▶ Tempo total gasto para a busca e agrupamento.

Construção de Ninho

- ▶ Realização da construção de ninho;
- ▶ Latência para o início da construção de ninho;

Comportamento de cifose

- ▶ Realização de cifose com todos os filhotes;
- ▶ Latência para ocorrência de cifose;
- ▶ Tempo total gasto na cifose (soma dos tempos parciais);

Comportamento de *nursing*

Nursing, neste trabalho, foi compreendido como o período em que a rata permaneceu sobre a ninhada, desempenhando ou não outras atividades como as de *grooming* de filhotes ou *self grooming*. Não foi considerado o tempo de cifo.

- ▶ Realização de *nursing*;
- ▶ Latência para ocorrência de *nursing*;
- ▶ Tempo total gasto *no nursing* (soma dos tempos parciais);

Grooming de filhote

- ▶ Realização de *grooming* de filhote;
- ▶ Latência para ocorrência do *grooming* de filhote;
- ▶ Tempo total gasto em *grooming* de filhote (soma dos tempos parciais);

Self grooming (autolimpeza)

- ▶ Realização de *self grooming*;
- ▶ Latência para ocorrência do *self grooming*;
- ▶ Tempo total gasto em *self grooming* (soma dos tempos parciais);

Forrageamento¹

- ▶ Realização de forrageamento;
- ▶ Latência para início do forrageamento;
- ▶ Tempo total gasto em forrageamento (soma dos tempos parciais);

Comportamento materno total

Entende-se CMT – comportamento materno total - por agrupamento de 8 filhotes, seguido de construção de ninho, seguido de cifo ininterrupta por pelo menos 3 minutos.

- ▶ Realização de CMT;
- ▶ Latência para a ocorrência de CMT.

Os parâmetros comportamentais listados só foram considerados em ratas cuja localização da cânula foi confirmada na PAG rostral lateral.

¹ Forrageamento – compreendido como exploração da gaiola moradia para a busca de alimento, sem que, no entanto, o tenha se disponibilizado.

3. 8. Análise Estatística

Os dados comportamentais foram analisados de maneira qualitativa e também de maneira quantitativa por meio de análise estatística com os pacotes estatísticos SPSS 12.0 *for Windows* e INSTAT *for Windows*. Para comportamentos com variáveis do tipo “realizou” ou “não realizou”, foi utilizado o teste de Fisher, os resultados foram expressos em porcentagem. Para algumas variáveis de tempo, como latência e para análise de escores, foi utilizado o teste de Mann-Whitney (teste U), os resultados desse teste foram expressos em termos de média $\pm$ S.E.M. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes sempre que $p \leq 0,05$.

Tabela 1 – Intervalos de tempo para os escores adotados.

Escore	
s	Intervalos de tempo
1	0 a 300s
2	301 a 600s
3	601 a 900s
4	901 a 1200s
5	1201 a 1500s
6	1501 a 1800s
7	maior que 1801s

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4. 1. Busca e Agrupamento

Os dados de busca e agrupamento foram anotados para os seguintes parâmetros: agrupar ou não os 8 filhotes recolocados na gaiola, o tempo total gasto para o agrupamento de todos os 8 filhotes e latência para a busca do primeiro filhote.

Para a realização de busca e agrupamento dos 8 filhotes foi encontrada diferença estatisticamente significativa no teste de Fisher com $p = 0,002$. Dessa forma, um número menor de ratas no grupo tratado com morfina ($n=16$) realizou o comportamento, apenas 6 (19%), e no grupo salina ($n=15$), 14 (45%) ratas realizaram o comportamento.

Figura 3 - Comportamento de busca e agrupamento dos 8 filhotes, percentual de ratas que realizaram agrupamento. Teste de Fisher, $*p < 0,005$.

Para avaliar o tempo total para o agrupamento até o último filhote foram aplicados escores, obtendo-se por meio do teste de Mann-Whitney $p = 0,002$, no grupo salina ($1,80 \pm 0,40$) e no grupo morfina ($5,25 \pm 0,63$).

Figura 4 - Comportamento de busca e agrupamento, tempo total (s) despendido para agrupamento dos 8 filhotes, média das latências por meio de escores. Teste de Mann-Withney , * $p < 0,005$.

O parâmetro de tempo total despendido na busca e agrupamento não revelou diferença estatisticamente significante entre os grupos.

4. 2. Construção de ninho

Para o parâmetro comportamental de construção de ninho, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento com morfina ou salina, segundo o teste de Fisher, em que $p = 0,009$. Com expressão do comportamento em 13 (42%) ratas do grupo salina ($n=15$), e em, apenas, 6 ratas (19%) do grupo morfina ($n=16$).

Figura 5 - Comportamento de construção de ninho, percentual de ratas que realizaram a construção. Teste de Fisher, * $p < 0,01$.

Na avaliação por meio de escores da latência para construção de ninho, observou-se pelo teste de Mann-Withney que houve uma diferença entre os grupos com $p = 0,05$. As médias dos grupos foram: salina ($2,4 \pm 0,56$) e morfina ($4,5 \pm 0,72$).

Figura 6 - Comportamento de construção de ninho, latência (s) para a construção. Média das latências por meio de escores. Teste de Mann-Withney , * $p = 0,05$.

4. 3. Cifose e *Nursing*

Para os parâmetros comportamentais de latência para ocorrência de cifose e o tempo total despendido na cifose, não houve diferença estatisticamente significativa segundo o teste de Mann-Withney.

A ocorrência de cifose sobre o grupo completo de filhotes (8 filhotes) revelou diferença estatisticamente significativa pelo teste Fisher, apresentando $p = 0,001$, com expressão do comportamento em 12 (46%) ratas do grupo salina ($n=14$) e, apenas, 2 (8%) ratas do grupo morfina ($n=12$).

Figura 7 - Comportamento cifose sobre os 8 filhotes, percentual de ratas que realizaram cifose. Teste de Fisher, * $p < 0,005$.

Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhuma das variáveis do parâmetro comportamental de *nursing* entre os grupos salina e morfina.

4. 4. *Grooming* de Filhote e *Self Grooming*

O *grooming* de filhote ocorreu em ambos os grupos com exceção de apenas uma rata do grupo morfina. Para esse parâmetro comportamental, foram avaliadas variáveis como: realização do comportamento e tempo total despendido no comportamento e, nessas variáveis não se encontrou diferença estatisticamente significativa, mas para o parâmetro de latência para ocorrência do *grooming* de filhote, houve diferença, fornecida por meio de escores, revelada pelo teste de Mann-Withney com $p = 0,046$. A média dos

grupos salina (n=15) e morfina (n=16) foi, respectivamente, de: $(1,80 \pm 0,40)$ e $(2,43 \pm 0,36)$.

Figura 8 - Comportamento de *grooming* de filhotes, latência (s) para a ocorrência do comportamento, média das latências por meio de escores. Teste de Mann-Withney, * $p < 0,05$.

Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos relativas às variáveis de *self grooming*.

4. 5. Forrageamento

No parâmetro de forrageamento não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes relativas à realização do comportamento ou, ao tempo total despendido nele. No entanto, na variável latência para ocorrência do forrageamento, foi encontrado $p = 0,049$. As médias das latências (s) no grupo salina ($n = 15$), e no grupo morfina ($n = 14$) foram, respectivamente, de: $(111,53 \pm 18,7)$ e $(59,21 \pm 14,5)$.

Figura 9 - Latência (s) para a ocorrência do comportamento de forrageamento, média das latências. Teste de Mann-Withney, * $p < 0,05$.

4. 6. Comportamento Materno Total

Para o parâmetro de comportamento materno total (CMT) que considera a ocorrência de busca e agrupamento dos 8 filhotes da ninhada, construção de ninho e cifo ininterrupta por pelo menos 3 minutos, foi encontrada diferença estatisticamente significativa revelada pelo teste de Fisher, em que $p = 0,003$. Dessa forma, um número menor de ratas no grupo tratado com morfina ($n=16$) realizou o comportamento, apenas 4 (13%), e no grupo salina ($n=15$), 12 (39%) ratas realizaram o comportamento.

Figura 10 - Comportamento Materno Total, percentual de ratas que realizaram CMT. Teste de Fisher, * $p < 0,005$.

E para avaliação da latência para ocorrência de CMT por meio de escores foi aplicado o teste de Mann-Whitney que revelou diferença estatisticamente significativa para os grupos com $p = 0,023$, cujas médias foram no grupo salina ($4,40 \pm 0,44$) e no, morfina ($6,00 \pm 0,47$).

Figura 11 - Comportamento Materno Total, latência (s) para a ocorrência do comportamento, média das latências por meio de escores. Teste de Mann-Withney, * $p < 0,05$.

4. 7. Localização das injeções na rPAGI

B

C

D

E

Figura 12 – Diagramas modificados de Paxinos and Watson (1986) mostrando os principais locais de injeção de morfina (elipses pretas) e de salina (retângulos cinza) na rPAGI. Níveis A – 5,8 mm; B – 6,04mm; C – 6,3mm; D – 6,72mm; E – 6,8mm; F – 7,04mm; (valores posteriores ao bregma). Por causa da sobreposição, o número de pontos ilustrados pode ser menor que o número de injeções efetivamente ocorridas. CLi núcleo caudal linear da Rafe; Dk - núcleo Darkschewitsch; DR – núcleo dorsal da Rafe; EW – núcleo Edinger-Westphal; III – núcleo oculomotor.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A morfina é um opióide que exerce ação inibitória sobre o correto desempenho do comportamento maternal. Tal paradigma farmacológico de investigação desse comportamento tem sido utilizado tanto por meio de injeções periféricas como centrais.

Injeções subcutâneas repetidas de morfina durante esse período atenuam significativamente a ocorrência do comportamento maternal (ŠLAMBEROVÁ *et al.*, 2001). O pré-tratamento com morfina durante a prenhez promove sensibilização nas ratas, as quais, no período de lactação, têm seu comportamento maternal inibido mediante uso de dose desafio menor (MIRANDA-PAIVA *et al.*, 2001).

O efeito inibitório da morfina sobre o CM pode ser revertido por naloxona em ratas (RUBIN; BRIDGES, 1984). E, ainda, por injeção de substâncias endógenas como CCK (MIRANDA-PAIVA; FELÍCIO, 1999).

Em estudos subseqüentes, por meio de protocolo de sensibilização, MIRANDA-PAIVA *et al.* (2003) demonstraram que a inibição do comportamento maternal alcançada pelo uso de morfina, administrada de modo sistêmico, podia ser revertida com injeção local de naloxona na rPAGl. MIRANDA-PAIVA *et al.* (2007), utilizando o mesmo protocolo de sensibilização, demonstraram a mesma reversão por meio de injeção local de CCK na rPAGl.

Segundo RENNO *et al.* (1992) a aplicação de morfina periférica reduz a liberação de GABA na PAG lateral, mas, não, na medial.

SUKIKARA *et al.* (2006) em paradigma envolvendo escolha alimentar e cuidado maternal verificaram que a rPAGI é uma área que parece estar envolvida na seleção de comportamentos adaptativos como caça predatória e o forrageamento. Ratas tratadas com baixas doses de morfina demonstram preferir a caça predatória de insetos ao cuidado maternal, quando o direcionamento motivacional parece ser alterado pela ação da rPAGI (SUKIKARA *et al.*, 2007).

A inibição do comportamento maternal promovida pela morfina injetada perifericamente, desvia a ação para a caça predatória, fenômeno que pôde ser revertido mediante lesão bilateral da rPAGI de ratas lactantes (SUKIKARA *et al.*, 2006).

TEODOROV *et al.* (2006) caracterizaram a rPAGI como uma área que mostra maior expressão do gene *Oprm1* que codifica para receptores opióides μ , além de expressar outros genes relacionados aos receptores κ e δ . Sendo que a suscetibilidade aos opióides poderia depender do estado fisiológico particular no qual a fêmea se encontra, como na prenhez e na lactação, podendo, por exemplo, tornar-se mais sensível à ação da droga (YIM *et al.*, 2006).

Neste trabalho, a aplicação de morfina na rPAG lateral confirmou algumas previsões propostas em trabalhos anteriores do laboratório de que haveria interferência opioidérgica no desempenho do comportamento maternal de ratas lactantes. Dessa

forma, a injeção unilateral de morfina na área se mostrou suficiente para inibir o comportamento materno total.

As ratas submetidas ao tratamento com morfina tiveram parâmetros comportamentais inibidos ou prejudicados. Dessa maneira, o grupo experimental apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com salina nos parâmetros de busca e agrupamento, de construção de ninho e na latência para o forrageamento e o *grooming* de filhotes. Em relação aos parâmetros de amamentação não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.

Depois dos comportamentos de pré-nutrição como a busca e o agrupamento de filhotes, a rata tende a permanecer no ninho, local onde realiza o *hover over* que consiste em lambe os filhotes e rearranjá-los com a boca (*mouthing*), de modo que eles possam ter acesso às tetas (STERN, 1997).

O período que compreende essas ações é chamado de *nursing*, no qual a mãe dirige uma série de comportamentos aos filhotes, podendo culminar no *crouching* super arqueado, que pode ser chamado de cifose fisiológica (STERN, 1997), uma postura quiescente que requer *inputs* somatossensoriais provenientes do tronco, como a sucção (LONSTEIN *et al.*, 1998).

No período de ocorrência da cifose, a mãe permanece relativamente imóvel numa postura bilateralmente simétrica, acompanhada da ventroflexão sustentada pela rigidez

das patas, as quais estão dispostas de modo a acomodar a cria (LONSTEIN; STERN, 1998; STERN, 1997; LONSTEIN; STERN, 1999).

STERN (1997) demonstrou que a posição de cifose requer sucção suficiente pelos filhotes, o que resulta em altos níveis de Fos mais que em outras condições de contato com os filhotes e em uma única área, a porção lateral e ventrolateral da PAG caudal. A sucção eliciaria a cifose por alterar a inibição tônica GABAérgica da cPAG via receptores GABA_A nesses neurônios, e, tal aumento de proteína Fos, na mesma situação, não é observado na PAG rostral (LONSTEIN; STERN, 1998).

Em ratas lesionadas em cPAG_{l, vl}, há redução de 85% da ocorrência do comportamento de cifose (LONSTEIN; STERN, 1997a; LONSTEIN *et al.*, 1998), assim como a retirada cirúrgica das tetas de ratas lactantes aumenta em 20% expressão de Fos na cPAG contralateral (LONSTEIN; STERN, 1999). As lesões de cPAG_{l, vl} refletem a interrupção do caminho motor descendente da PAG para o bulbo e medula espinhal, os quais são necessários para esse reflexo (LONSTEIN; STERN, 1998) e reduzem severamente a postura sem interferir em outros parâmetros comportamentais tais como a lactação (LONSTEIN; STERN, 1997a; LONSTEIN; VRIES, 2000). Além disso, lesões de PAG rostral se mostraram ineficazes em inibir a cifose (LONSTEIN; STERN, 1997a) e interações com filhotes mamando elevam Fos-ir no nível intercolicular da cPAG, mas não nos outros três níveis rostro-caudais dessa estrutura (LONSTEIN; STERN, 1997b).

Neste trabalho, a cifose foi considerada quando observada por um período mínimo consecutivo de 3 minutos sobre toda a ninhada ou parte dela. Os resultados aqui reportados não revelaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com tratamento salina e tratamento morfina e são coerentes com observações relatadas por outros autores. As ratas mantêm as atividades quiescentes e reflexas de cuidados dos filhotes, corroborando uma ausência de função específica para o *nursing* e a cifose na rPAGl.

No entanto, é importante ressaltar que qualitativamente foi observado déficit posicional da cifose realizada pelas ratas com tratamento morfina, e, houve momentos em que as ratas pareciam não responder prontamente à vocalização deles. STERN, 1997, cita que essas vocalizações, muitas das quais são ultrasônicas, provêm pistas para inibir ações que podem levar a injúria, como pisoteá-los.

Há, porém, ao longo da cifose, vocalizações audíveis que estimulam a retomada do arqueamento durante a amamentação, visto que existe uma tendência de declínio da postura. Essa retomada aparece de maneira menos conspícua no grupo tratado com morfina e, além disso, nesse grupo é visualizada tendência maior a realização de posições intermediárias, mas ainda consideradas de cifose.

A posição *supine* é verificada quando a rata deita-se com o dorso de lado, com os filhotes aderidos às suas tetas e a posição *prone* é verificada quando não há suporte nas

patas (LONSTEIN; STERN, 1998). Posturas semelhantes a essas, foram identificadas em alguns momentos nas ratas que receberam injeção de morfina na rPAGl.

O único parâmetro relacionado à amamentação em que houve diferença estatisticamente significativa, foi no de cifose realizada sobre todos os filhotes. Ou seja, apesar de não serem verificadas diferenças na realização da cifose, os dados, até então, apresentados não levavam em consideração se o comportamento ocorria sobre toda a ninhada.

É possível que no momento da amamentação, um dos filhotes fique por algum tempo sem acesso, isso pode ser observado em ratas com tratamento salina. No entanto, o que foi observado com as ratas do grupo tratado com morfina é que pareciam ter certa avidez em realizar a cifose de maneira rápida sem prévia construção de ninho nem agrupamento de todos os filhotes e, por isso, mesmo com filhotes espalhados na gaiola, a rata dava início à amamentação deixando de exibir cuidado maternal com grande parte da ninhada, talvez, pelo fato de que ao se aproximar dos filhotes, mesmo que fossem poucos, eles iniciavam a sucção que eliciaria tal comportamento reflexo.

Os problemas observados na amamentação do grupo de filhotes decorrem do déficit de busca e agrupamento nas ratas tratadas com morfina. Esse grupo também apresentou média maior em termos de latência para a finalização do agrupamento.

Em experimentos de lesão, LONSTEIN; STERN (1997a) verificaram que o comportamento de busca foi essencialmente normal depois que a cPAGI,VI foi lesionada, em termos de número de filhotes, assim como a latência para a busca do primeiro filhote.

Por meio dos resultados aqui obtidos, parece que a rPAGI é uma área que desempenha alguma influência sobre a busca e o agrupamento em ratas lactantes. Esse comportamento ativo que envolve deslocamento na gaiola moradia, normalmente, é sucedido por outro comportamento que é o de construção de ninho. Nessa etapa, após agrupar os filhotes a rata geralmente revolve a maravalha de maneira a montar rapidamente um local adequado para a amamentação e, durante a construção, ela pode forragear brevemente.

Houve diferença estatisticamente significativa para a construção de ninho. Portanto, as ratas tratadas com morfina apresentaram déficit nesse parâmetro e, quando conseguiam desempenhá-lo, realizavam-no com média de latência maior, ou seja, eram mais lentas na tarefa.

O que foi observado em termos qualitativos é que as ratas tratadas com morfina tendiam a explorar mais a gaiola, tanto no período em que agrupavam os filhotes, quanto no período subsequente relativo à montagem de ninhos. As ratas pareciam mais desorientadas em termos de finalização de comportamento, ou seja, enquanto animais tratados com salina colocavam rapidamente seus filhotes num só grupo, as ratas tratadas com morfina abocanhavam os filhotes, largando-os repetidas vezes, intercalando tal

comportamento com exploração da gaiola e, posteriormente, formando mais de um grupo de filhotes ou, simplesmente, ignorando alguns deles. Depois do mal sucedido agrupamento, reviravam maravalha sem necessariamente direcioná-la para a construção de um ninho.

No parâmetro de forrageamento, houve latência maior no grupo salina em relação ao grupo morfina, revelando que as ratas tratadas com o opióide tendiam a iniciar mais rapidamente a exploração do ambiente em detrimento das atividades típicas primárias de cuidado maternal. Assim como houve diferença estatisticamente significativa, no estabelecimento do *grooming* de filhotes, com latência maior no grupo tratado com morfina. Esse dado é consistente com observações de que as ratas, sob ação dos opióides, permaneciam muito atentas aos pequenos estímulos do ambiente e demoravam mais tempo inicialmente cheirando-o em detrimento da ação direta sobre os filhotes. O *self-grooming* manteve-se preservado.

É verificável, portanto, o não engajamento das ratas tratadas com morfina no estabelecimento do comportamento maternal, para as quais, o início das atividades que envolvem uma escolha comportamental, revela a preferência pela exploração da gaiola moradia em atividade como a de forrageamento. Atividades reflexas, como de cifose, se iniciam normalmente, uma vez que dependem de outros sítios cerebrais para o seu controle.

COMOLI *et al.* (2003) apontam os dois terços anteriores rostrais da PAG lateral como área envolvida na caça predatória, a qual recebe projeções de áreas cerebrais como mPFC que estariam envolvidas no ciclo percepção-ação e teriam papel crítico no planejamento comportamental, além disso, a PAGl seria conhecida por receber *inputs* da área medial do núcleo central da amígdala, o qual tem aumento de expressão de Fos na caça predatória e, nesse contexto, a PAGl poderia representar um mecanismo de defesa adaptativa contra potenciais perigos em confrontação com a presa.

MIRANDA-PAIVA *et al.* (2003) determinaram um padrão de ativação da rPAGl por meio da expressão de proteína Fos, padrão que ocorre quando há inibição do comportamento maternal no paradigma de ação da morfina injetada perifericamente.

A área da PAG lateral mobilizada durante a predação de insetos também recebe projeções da área retroquiasmática (RIBEIRO-BARBOSA *et al.*, 1999 *apud* SUKIKARA, 2006) e do núcleo hipotalâmico ventromedial (CANTERAS; GOTO, 1999 *apud* SUKIKARA, 2006), sendo que a área retroquiasmática estaria relacionada a circuitaria hipotalâmica que regula a alimentação (WATTS *et al.*, 1999 *apud* SUKIKARA, 2006). Fibras ascendentes da rPAGl provêm um *input* robusto para área hipotalâmica lateral e numa menor extensão para o núcleo talâmico intralaminar, no hipotálamo as fibras se distribuem dorsolateralmente ao fórnix, no qual se concentram neurônios MCH (hormônio concentrador de melanina) e H/O (orexina), o que colocaria a rPAGl como possível área candidata ao controle da atividade de forrageamento (MOTA-ORTIZ *et al.*, 2007).

Esses recentes dados neuroanatômicos associados ao paradigma de escolha proposto por SUKIKARA (2006), no qual foi testada a ação opioidérgica que induz a caça predatória de insetos em detrimento do cuidado maternal, e os resultados expostos por este trabalho, corroboram a área da rPAGI como selecionadora de estratégias, um centro de seleção de respostas comportamentais adaptativas.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- Injeções de morfina na rPAGI afetam, sobretudo, atividades de estabelecimento do comportamento maternal, tal como busca e agrupamento e construção de ninho, sem afetar, no entanto, em atividade reflexa como a de cifose;
- A interferência que a morfina exerce sobre a rPAGI poderia revelar influência de conexões anatômicas com outros sítios cerebrais, principalmente com aqueles relacionados ao hipotálamo que regulam alimentação;
- A interferência que a morfina exerce sobre a rPAGI poderia revelar relação da área na participação de estratégias em respostas comportamentais adaptativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray.

Progress in Neurobiology. V. 46, pp. 575-605. 1995.

BORELLI, K. G.; NOBRE, M. J.; BRANDÃO, M. L.; COIMBRA, N. C. Effects of acute chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** V. 77, pp. 557-566. 2004.

BRIDGES, R. S. A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence, and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat.

Endocrinology. V. 114, pp. 930-940. 1984.

CANTERAS, N. S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of the rats exposed to a natural predator. **Neuroreport**, V. 10, pp. 413-418, 1999.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of FOS immunoreactivity in the

PAG. **Behavioural Brain Research.** V. 138, pp. 17-28. 2003.

* Referências citadas segundo: "Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso" do Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBi - USP, São Paulo, 2004.

DEPAULIS, A.; MORGAN, M. M.; LIEBESKIND, J. C. GABAergic modulation of the analgesic effects of morphine microinjected in the ventral periaqueductal gray matter of the rat. **Brain Research**. V. 436, pp. 223-228. 1987.

FELÍCIO, L. F., MANN, P. E., BRIDGES, R. S. Intracerebroventricular cholecystokinin infusions block β -endorphin-induced disruption of maternal behavior. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. V. 39, pp. 201-204. 1991.

FONTES, M.; MENEZES, R. C. A.; VILLELA, D. C.; SILVA JÚNIOR, L. G. S. O hipotálamo dorsomedial e a organização da resposta cardiovascular ao estresse emocional: uma perspectiva funcional. In: X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR, 10, 13-20/ jan./mar 2006. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, 2006. Capítulo II.

GROTA, L. J.; ADER, R. Continuous recording of maternal behaviour in *Rattus norvegicus*. **Animal Behavior**. V. 17, pp. 722-729, 1969.

GROTA, L. J.; ADER, R. Behavior of lactating rats in a dual-chambered maternity cage. **Hormones and Behavior**. V. 5, pp. 275-282. 1974.

GUBERNICK, D. J.; KLOPPER, R. S. (Eds). **Parental Care in Mammals**. New York: Plenum Press, 1981.

KEAY, K. A.; FEIL, K.; GORDON, B. D.; HERBERT, H.; BANDLER, R. Spinal afferents to functionally distinct periaqueductal gray columns in the rat: An anterograde and retrograde tracing study. **The Journal of Comparative Neurology**. V. 385, pp. 207-229. 1997.

KEAY, K. A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neuroscience and Behavioral Reviews**. V. 25, pp. 669-678. 2001.

KINSLEY, C. H.; MORSE, A. C.; ZOUMAS, C.; CORL, S.; BILLACK, B. Intracerebroventricular infusions of morphine, and blockade with naloxone, modify the olfactory preferences for pup odors in lactating rats. **Brain Research Bulletin**. V. 37, N. 1, pp. 103-107. 1995.

KLOP, E. M.; MOUTON, L. J.; KUIPERS, R.; HOLSTEGE, G. Neurons in the lateral sacral cord of the cat project to periaqueductal grey, but not to thalamus. **European Journal of Neuroscience**. V. 21, pp. 2159-2166. 2005.

LONSTEIN, J. S.; STERN, J. M. Role of the midbrain periaqueductal gray in maternal nurturance and aggression: *c-fos* and electrolytic lesion studies in lactating rats. **The Journal of the Neuroscience**. V. 17, N. 9, pp. 3364-3378. 1997a.

LONSTEIN, J. S.; STERN, J. M. Somatosensory contributions to *c-fos* activation within the caudal periaqueductal gray of lactating rats: effects of perioral, rooting, and suckling stimuli from pups. **Hormones and Behavior**. V. 32, pp. 155-166. 1997b.

LONSTEIN, J. S.; SIMMONS, D. A.; SWANN, J. M.; STERN, J. M. Forebrain expression of *c-fos* due to active maternal behaviour in lactating rats. **Neuroscience**. V. 82, N. 1, pp. 267-281. 1998.

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

LONSTEIN, J. S.; STERN, J. M. Effects of unilateral suckling on nursing behavior and *c-fos* activity in the caudal periaqueductal gray in rats. **Dev. Psychobiol.** V. 35, pp. 264-275. 1999.

LONSTEIN, J. S.; WAGNER, C. K.; DE VRIES, G. J. Comparison of the “Nursing” and other parental behaviors of nulliparous and lactating female rats. **Hormones and Behavior**. V.36, pp. 242-251. 1999.

LONSTEIN, J. S.; DE VRIES, G. J. Maternal behaviour in lactating rats stimulates *c-fos* in glutamate decarboxylase-synthesizing neurons of the medial preoptic area, ventral bed nucleus of the stria terminalis, and ventrocaudal periaqueductal gray. **Neuroscience**. V. 110, N. 3, pp. 557-568. 2000.

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

MARSON, L.; FOLEY, K. A. Identification of neural pathways involved in genital reflexes in the female: a combined anterograde and retrograde tracing study. **Neuroscience**. V. 127, pp. 723-736. 2004.

MARTIN, J. H. **Neuroanatomia: texto e atlas**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1998.

MCGARAUGHTY, S.; FARR, D. A.; HEINRICHER, M. Lesions of the periaqueductal gray disrupt input to the rostral ventromedial medulla following microinjections of morphine into the medial or basolateral nuclei of the amygdala. **Brain Research**. V. 1009, pp. 223-227. 2004.

MCKIM, W. A. Drugs and Behavior: **An introduction to behavioral pharmacology**. 5th ed. New Jersey: Prentice Hall. pp. 261-282. 2003.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; FELÍCIO, L. F. Differential role of cholecystokinin receptor subtypes in opioid modulation of ongoing maternal behavior. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. V. 64, N. 1, pp. 165-169. 1999.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; NASELLO, A. G., YIN, A. J.; FELÍCIO, L. F. Morphine pretreatment increases opioid inhibitory effects on maternal behaviour. **Brain Research Bulletin**. V. 55, N. 4, pp. 501-505. 2001.

MIRANDA-PAIVA, C. M. **Relação colecistocinina-opióides no controle do comportamento maternal**. Tese (Doutorado). Pós-graduação em Neurociências e Comportamento, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S.; FELÍCIO, L. F.

A role for the periaqueductal grey in opioidergic inhibition of maternal behaviour.

European Journal of Neuroscience. V. 18, pp. 667-674. 2003.

MIRANDA-PAIVA, C. M., CANTERAS, N. S., SUKIKARA, M. H., NASELLO, A. G.,

MACKOWIAK, I. I., FELICIO, L. F. Periaqueductal gray cholecystokinin infusions

block morphine-induced disruption of maternal behavior. **Peptides.** V. 28, pp. 657–

662. 2007.

MOTA-ORTIZ, S. R.; BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F.; CANTERAS, N. S. Ascending

projections from the rostral lateral periaqueductal gray (rIPAG): A critical site for

controlling foraging behavior. In: Abstracts of the International Behavioral

Neuroscience. V. 16, 2007, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro, 2007. p. 68.

MOUTON, L. J.; KLOP, E-M.; HOLSTEGE, G. Lamina I-periaqueductal gray (PAG)

projections represent only a limited part of the total spinal and caudal medullary input

to the PAG in the cat. **Brain Research Bulletin.** V. 54, pp. 167-174. 2001.

MOUTON, L. J.; KLOP, E-M.; BROMAN, J.; ZHANG, M.; HOLSTEGE, G. Lateral cervical nucleus projections to Periaqueductal Gray Matter in cat. **The Journal of Comparative Neurology**. V. 471, pp. 434-445. 2004.

NUMAN, M. MATERNAL BEHAVIOR. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D., eds. **The physiology of reproduction**, 2nd ed. New York: Raven Press. Cap. 37, pp. 221-302. 1994.

PAREDES, J.; WINTERS, R. W.; SCHNEIDERMAN, N.; MCCABE, P. M. Afferents to the central nucleus of the amygdala and functional subdivisions of the periaqueductal gray: neuroanatomical substrates for affective behavior. **Brain Research**. V. 887, pp. 157-173. 2000.

PAVESI, E.; ENCK, M. C., DE TOLEDO, C. A. B.; TERENCE, M. G. Disruption of maternal behaviour by acute conspecific interaction induces selective activation of the lateral periaqueductal grey. **European Journal of Neuroscience**. V. 26, pp. 2055-2065. 2007.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2nd ed. San Diego: Academic Press Inc. 1986.

RENNO, W. M.; MULLETT, M. A.; BEITZ, A. J. Systemic morphine reduces GABA in the lateral but not the medial portion of the midbrain periaqueductal gray of the rat. **Brain Research**. V. 594, pp.221-232. 1992.

RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; SKORUPA, A. L.; CIPOLLA-NETO, L.; CANTERAS, N. S. Projections of the basal retrochiasmatic area: a neural site involved in the photic control of pineal metabolism. **Brain Research**. V. 830, pp. 35-40, 1999.

RUBIN, B. S.; BRIDGES, R. S. Disruption of ongoing maternal responsiveness in rats by central administration of morphine sulfate. **Brain Research**. V. 307, pp. 91-97. 1984.

SEMENENKO, F. M.; LUMB, B. M. Excitatory projections from the anterior hypothalamus to periaqueductal gray neurons that project to the medulla: a functional anatomical study. **Neuroscience**. V. 94, pp. 163-174. 1999.

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

STERN, J. M. Offspring-Induced Nurturance: Animal-Human Parallels. **Dev Psychobiol.** V. 31, pp.19-37. 1997.

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

STILLER, C-O.; BERGQUIST, J. B., OLOF; E., ROLF; BRODIN, E. Local administration of morphine decreases the extracellular level of GABA in the periaqueductal gray matter of freely moving rats. **Neuroscience Letters.** V. 209, pp. 165-168. 1996.

SUKIKARA, M. H. **Participação opioidérgica na seleção de comportamentos próprios da espécie durante a lactação.** Tese (Doutorado). Pós-graduação em Neurociências e Comportamento, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

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

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

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

TORTORICI, V.; MORGAN, M. M. Comparison of morphine and kainic acid microinjections into identical PAG sites on the activity of RVM neurons. **Journal of Neurophysiology**. V. 88, pp. 1707-1715. 2002.

TORTORICI, V.; NOGUEIRA, L.; SALAS, R.; VANEGAS, H. Involvement of local cholecystokinin in the tolerance induced by morphine microinjections into the periaqueductal gray of rats. **Pain**. V. 102, pp. 9-16. 2003.

TSUKAHARA, S.; YAMANOUCHI, K. Neurohistological and behavioral evidence for lordosis-inhibiting tract from lateral septum to periaqueductal gray in male rats. **The Journal of Comparative Neurology**. V. 431, pp. 293-310. 2001.

VIANNA, D. M. L.; BRANDÃO, M. L. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 36, pp. 557-566. 2003.

WATTS, A. G.; SANCHEZ-WATTS, G.; KELLY, A. B. Distinct patterns of neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus are associated with dehydration-induced anorexia. **The Journal of Neuroscience**. V. 19, pp. 6111-6121, 1999.

WELLMAN, J.; CARR, D.; GRAHAM, A.; JONES, H.; HUMM, J. L.; RUSCIO, M.; BILLACK, B.; KINSLEY, C. H. Preoptic area infusions of morphine disrupt – and naloxone restores – parental-like behavior in juvenile rats. **Brain Research Bulletin**. V. 44, N. 2, pp.183-191. 1997.

YAKSH, T. L.; YEUNG, C. J.; RUDY, T. A. Systematic examination in the rat of brain sites sensitive to the direct application of morphine: observation of differential effects within the periaqueductal gray. **Brain Research**. V. 114, pp. 83-103. 1976.

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