

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
COMPORTAMENTO**

RENATA GONÇALVES DE VASCONCELOS

**EFEITO DA INFLUÊNCIA DA ANÓXIA NEONATAL NO COMPORTAMENTO
MATERNAL E NO DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO E SENSORIO-MOTOR DE
RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Comportamento do Instituto de
Psicologia da Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Nogueira

SÃO PAULO

2013

**T
RB150.A67
V331e
e.1**

RENATA GONÇALVES DE VASCONCELOS

**EFEITO DA INFLUÊNCIA DA ANÓXIA NEONATAL NO COMPORTAMENTO
MATERNAL E NO DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO E SENSORIO-MOTOR DE
RATOS WISTAR**

(versão corrigida)



Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Nogueira

SÃO PAULO

2013

3 BDTD

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

T

RB150.A67

V3322

2.2

Catálogo na publicação

Biblioteca Dante Moreira Leite

Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Vasconcelos, Renata Gonçalves de.

Efeito da influência da anóxia neonatal no comportamento materno e no desenvolvimento somático e sensorio-motor de ratos wistar / Renata Gonçalves de Vasconcelos; orientadora Maria Inês Nogueira. -- São Paulo, 2013.

97 f.

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

1. Anóxia 2. Comportamento materno (animal) 3. Reflexos
4. Neurônios 5. Ratos Wistar I. Título.

RB150.A67



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 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 134 nas fls. 38 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Maria Inês Nogueira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Efeitos da anóxia neonatal no encéfalo de ratos: alterações morfológicas, expressão da proteína Fos e sua inter-relação com o sistema serotoninérgico**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Silvia Honda Takada, Paula Hiromi Ito, Renata Gonçalves de Vasconcellos**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **21.11.2006**.

São Paulo, 22 de novembro de 2006.

Prof. Dr. UBIRATAN FABRES MACHADO
Coordenador da CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da CEEA - ICB/USP

DEDICATÓRIA

A Maria Inês,

A sempre mais maternal de todas as mães que já conheci. Que agarra sua cria dentro de um laboratório e a ela oferece o que melhor há nela: amor. Um amor sem preconceito. Sem julgamento. Sem crítica. Amor sem medida. Como pode amar o desconhecido? Levarei essa ternura dela para onde eu for.

“Quero que você descubra o que é arte e ciência

Quero que você perceba o que é ciência e arte

Você então vai poder sentir que tem arte na ciência

E você vai entender que tem ciência na arte”

(Cordel de apresentação

Projeto Arte & Ciência no Parque –

Kalunga e Iara castro)

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Marcelo Fernandes, coordenador do programa de pós-graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela valiosa colaboração ao financiar este estudo por meio de bolsa de estudos (Processo 2009/51276-0) e projeto Auxílio Pesquisa 2010/15703-9.

A minha orientadora Maria Inês Nogueira. A grande parceira de todos os momentos. E a sua doce família.

A Vânia Moura, pesquisadora do Instituto Butantan, pelo aprendizado e ensinamento constante. Uma colaboração sempre tão estimada.

A Clarice, secretária do programa de pós-graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, que nos momentos em que eu achei que fosse fraquejar, foi dela que partiu a frase: “força, ainda não acabou”.

A Cristininha, gerente de importação do departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, a amiga paulistana mais cúmplice que fiz e que faz parte da minha vida.

Aos companheiros do lab de Neurociências do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo: Wylma, Vitor, Renata, Leila, Silvinha, Vanderlei, Rômulo, Rene, Bárbara. Todos vocês, cada qual com sua particularidade e diferenças, permitem o nosso enriquecimento e amadurecimento pessoais.

Aos amigos técnicos do laboratório de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo: Adão, Tim, Milton, Carlinhos, Edinho, Amaro (*in memorian*), que faziam das nossas horas de estudos e preparo de aulas práticas debruçadas nos cadáveres mais suaves dados profissionalismo e cumplicidade em ajudar. A vocês, meus sinceros agradecimentos e eternas saudades.

A todos os amigos dos outros laboratórios do departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Aos amigos do Biotério departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo: Renivaldo, Fábio, Ricardo, Rodrigo.

Aos amigos da tesouraria do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo: Zulma, Marcela, Luciana, Eliana, Ivan (*in memorian*).

Às queridas secretárias do departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Patrícia e Cristiane.

Aos funcionários da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo: Maria, Ana Paula, Socorro, Edilson, Antônio e Renata. Os meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos, disponibilidade e companheirismo constantes.

A querida Plu e minha Bolacha (Maria Eduarda), que sempre extrapolaram os limites da amizade para além da universidade. Foram muitas gargalhadas ao longo desses anos. Amém.

A Mainha, Cília, Laís e Rodrigo. Foram longos sete anos distantes. A ponte aérea SP-REC-SP era uma constante, mas não era suficiente para tirar o aperto que a saudade causava em mim. O que mais sentia falta era da rotina. Agora chegou o fim de um ciclo, por mim, tão sonhado, ainda caloura, recém-chegada na Faculdade de Odontologia da UFPE. E compartilho com vocês tamanha alegria a minha, amada família: “a vitória é minha, mas o orgulho é nosso”. Sempre.

A minha família pernambucana *living in* São Paulo, para qual todos os encontros eram sempre, “tchipo assim”, “nooossa cara”, *o melhor encontro do mundo*. Certamente, sem vocês não teria sido a mesma coisa: Lu e Brunão, Brenão e Adri, Fabão, Marina, Luciene, Flávia, Léo e Hilário, Prima Juli, Thiago, Henrique, Mari Gabriela, Leyka (esta, embora paulistana, recebeu título de cidadã pernambucana).

RESUMO

VASCONCELOS, R.G. **Efeito da influência da anóxia neonatal no comportamento materno e no desenvolvimento somático e sensório-motor de ratos wistar.** 2013. 97 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O objetivo deste estudo foi analisar a influência da anóxia neonatal no comportamento materno e no desenvolvimento somático e sensório-motor dos filhotes e a ativação de neurônios fos-IR em áreas encefálicas relacionadas ao comportamento materno mediante insulto anóxico no 5º dia de lactação. Assim, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro aborda a influência da anóxia sobre o comportamento materno e o segundo a influência da anóxia sobre o desenvolvimento somático e de reflexos. A interação mãe-filhotes foi monitorada por câmera de vídeo no 3º e 5º dias de lactação. Os resultados obtidos após monitoramento de 24 horas (12 h/claro e 12 h/escuro, n = 10), permite-nos inferir que no 3º dia, no ciclo claro, as ratas realizam mais comportamentos de cuidados com a prole, como agrupamento, construção de ninho e amamentação, enquanto que no ciclo escuro realizam atividades gerais próprios, como, *self-grooming*, alimentação ou ficam em descanso. Já no 5º dia, as ratas, seja no claro ou no escuro, amamentam de modo semelhante. Entretanto, quando comparamos com o 3º dia, os comportamentos de lambar e agrupar ocorrem de maneira significativamente maior. O insulto anóxico no 5º dia de lactação também modificou os padrões do comportamento materno durante um ciclo de 30 minutos. Mães cujos filhotes sofreram anóxia amamentaram menos que as mães com filhotes do grupo Controle, entretanto, gastaram mais tempo realizando os comportamentos de auto-limpeza, lambar e forragear. O padrão de ativação de neurônios fos-IR da MPA e PAG foi diferente entre os grupos Anóxia e Controle. No segundo capítulo, foi avaliada a ontogênese de reflexos e o desenvolvimento somático dos filhotes. Um dia após o parto 8 neonatos foram selecionados e mantidos com suas mães do 1º ao 21º dia pós-natal. No 5º dia de lactação, os filhotes foram divididos em dois grupos: Anóxia e Controle, conforme tenha sofrido ou não insulto anóxico, e foram devolvidos as suas mães. O investigador "cego" desconhecia a que grupo pertencia cada animal avaliado quanto ao: peso corporal, eixo longitudinal do corpo, comprimento da cauda, eixo látero-lateral do crânio e eixo ântero-posterior do crânio. Também foram avaliados quanto ao aparecimento dos seguintes reflexos: recuperação do decúbito, colocação pelas vibrissas, aversão ao precipício, geotaxia negativa, resposta ao susto e aceleração. Foi registrado o dia de maturação das características físicas: abertura do pavilhão auricular, abertura do conduto auditivo, irrupção dos incisivos superiores e inferiores e abertura dos olhos. Houve aumento no ganho de peso corporal e maior crescimento do eixo longitudinal do corpo durante o período de lactação dos filhotes que sofreram anóxia em relação ao grupo Controle. Houve atraso na ontogênese da maioria dos testes reflexos dos filhotes do grupo Anóxia. Os resultados deste estudo demonstram os efeitos prejudiciais da anóxia sobre o crescimento somático e desenvolvimento sensório-motor. A anóxia também modifica padrões do comportamento materno que poderá influenciar as gerações seguintes.

Palavras-Chave: Anóxia. Comportamento materno. Reflexos. Fos. Ratos Neonatos.

ABSTRACT

VASCONCELOS, R.G. Effect of neonatal anoxia influence on the maternal behavior and of development and somatic sensorimotor of rats wistar. 2013. 97 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The aim of this study was to analyze the influence of neonatal anoxia on maternal behavior and on somatic and sensorimotor development in offspring and the activation of fos-IR neurons in brain areas that are related to maternal behavior, by anoxic insult in the 5th day of lactation. Thus, this study was divided into two chapters. The first one addresses to the influence of anoxia on maternal behavior and the second one address to the influence of anoxia on somatic development and reflexes. The mother-offspring interaction was monitored by video camera in the 3rd and 5th day of lactation. The results obtained after 24 hours of monitoring (12 h/light and 12h/dark , n = 10), allows us to infer that in the 3rd day, in the light cycle, the rats perform more tasks related to offspring care, like grouping, nest construction and breastfeeding, while in the dark cycle they perform more general tasks like self-grooming, feeding or remain in rest. Although, in the 5th day the rats, either in light or dark cycle, breastfed similarly. However, in comparison with the 3rd day the licking and grouping behaviors were significantly higher. The anoxic insult on the 5th day of lactation also modified the pattern of maternal behavior during a 3 minute cycle. Mother whose offspring suffer anoxic breastfed less than the mothers in the control group, however those spent more time performing self-cleaning, licking and forregement behaviors. The activation pattern of IR-fos neurons of MPA and PAG were different between the anoxic and the control group. In the second chapter, it was evaluated offspring reflex ontogeny and somatic development. One day after the birth 8 neonates were selected and maintained with their mothers until the 21th post-natal day. On the 5th day of lactation, the offspring were divided into two groups: anoxic and control, depending on whether or not they suffered anoxic insult, and then were returned to their mothers. The blind investigator was unaware to which group belongs each evaluated animal as to: body weight, antero-posterior axis of the body, tail length. Were also evaluated as to the appearance of some reflex: righting, vibrissa placing, cliff avoidance, negative geotaxis, auditory startle response and free-fall righting. It was recorded the day of maturity of the physical features like: unfolding of the external ears and opening of the internal auditory conduit, eruption of upper and lower incisors and eyes opening during the period of lactation. There was an increase in the gain of body weight and in longitudinal axis development during offspring lactation period that suffered anoxia related to the control group. There was a delay in reflex ontogeny on those offspring that suffered anoxia. The result of this study demonstrates the prejudicial effects of the anoxia when related to somatic growth and sensorimotor development in rats during critical steps of nervous system development. The anoxia also modified maternal behavior patterns that could influence the future generations.

Key-words: Anoxia. Maternal behaviors. Reflexes. Fos. Neonatal rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema de monitoramento diário do comportamento materno de ratas.....	27
Figura 2 - Parâmetros de comportamento materno em ratas.....	28
Figura 3 - Parâmetros de comportamento materno em ratas.....	29
Figura 4 - Sistema de análise de comportamentos. The EthoLog.....	30
Figura 5 - Sistema utilizado para provocar anóxia em ratos neonatos.....	31
Figura 6 - Padrão de contagem e avaliação qualitativa de neurônios c-Fos-IR.....	37
Figura 7 - Tempo, em segundos, gasto no 3º dia de lactação com os comportamentos maternos avaliados.....	42
Figura 8 - Tempo, em segundos, gasto no 5º dia de lactação com os comportamentos maternos avaliados.....	46
Figura 9 - Fotomicrografias em campo claro (4 x) de cortes coronais (30 µm) de ratas reagidos contra proteína Fos evidenciando a região do córtex piriforme e do núcleo acumbens.....	56
Figura 10 - Fotomicrografias em campo claro (4 x) de cortes coronais (30 µm) de ratas reagidos contra proteína Fos evidenciando a região do tubérculo olfatório e do núcleo caudado e putame.....	57
Figura 11 - Fotomicrografias em campo claro (4 x) de cortes coronais (30 µm) de ratas reagidos contra proteína Fos evidenciando a área septal.....	58
Figura 12 - Fotomicrografias em campo claro (4 x) de cortes coronais (30 µm) de ratas reagidos contra proteína Fos evidenciando a região ventral do pálido e região paraventricular do tálamo.....	59
Figura 13 - Fotomicrografias em campo claro (4 x) de cortes coronais (30 µm) de ratas reagidos contra proteína Fos evidenciando a região a substância cinzenta periaquedutal.....	60
Figura 14 - Fotomicrografias em campo claro (4 x) de cortes coronais (30 µm) de ratas reagidos contra proteína Fos evidenciando a área pré-óptica medial.....	61
Figura 15 - Fotomicrografias em campo claro (4 x) de cortes coronais (30 µm) de ratas reagidos contra proteína Fos evidenciando o hipotálamo.....	62
Figura 16 - Fotos dos procedimentos da análise do crescimento somático.....	73
Figura 17 - Fotos dos procedimentos das avaliações das características físicas.....	74
Figura 18 - Fotos do reflexo de recuperação do decúbito.....	75
Figura 19 - Fotos do reflexo de colocação pelas vibrissas.....	75
Figura 20 - Fotos do reflexo de aversão ao precipício.....	76
Figura 21 - Fotos do reflexo de geotaxia negativa.....	76
Figura 22 - Fotos do reflexo de resposta ao susto.....	77
Figura 23 - Fotos do reflexo de aceleração.....	77
Figura 24 - Efeito da anóxia sobre os eixos látero-lateral e antero-posterior do crânio de ratos neonatos machos.....	79
Figura 25 - Efeito da anóxia sobre o peso corporal e o eixo longitudinal do corpo de ratos neonatos machos.....	80
Figura 26 - Efeito da anóxia sobre o comprimento da cauda de ratos neonatos machos.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média do tempo (s) dos comportamentos maternos avaliados no período claro (12h) e escuro (12 h) de ratas no 3º dia de lactação.....	41
Tabela 2 - Média do tempo (s) dos comportamentos maternos avaliados no período claro (12h) e escuro (12 h) de ratas no 5º dia de lactação.....	45
Tabela 3 - Média do tempo (s) dos comportamentos expressos pela mãe avaliados no período claro (12 h) e escuro (12 h) no 3º e 5º dias de lactação.....	49
Tabela 4 - Média do tempo (s) dos comportamentos maternos avaliados durante um ciclo de 30 min. de amamentação de ratas com filhotes Anóxia e Controle.....	54
Tabela 5 - Análise qualitativa dos neurônios fos-IR nos grupos Controle e Anóxia.....	55
Tabela 6 - Efeito da anóxia em neonatos machos sobre o desenvolvimento de características físicas e a maturação de reflexos.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3V - terceiro ventrículo
- AcbC - núcleo acumbens
- BST - núcleo “bed” da estria terminal
- CPu - núcleo caudado e putame
- DM – núcleo dorso-medial do hipotálamo
- LSD - parte dorsal do núcleo septal
- LSV - parte ventral do núcleo septal
- MPA - área pré-óptica medial
- PAG - substância cinzenta periaquedutal
- PAGd – parte dorsal da substância cinzenta periaquedutal
- PAGdl – parte dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal
- PAGl - parte lateral da substância cinzenta periaquedutal
- PAGvl - parte ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal
- Pe -zona periventricular do hipotálamo
- PH - área hipotalâmica posterior
- Pir - córtex piriforme
- PV - paraventricular do tálamo
- PVH - núcleo paraventricular do hipotálamo
- Tu - tubérculo olfatório
- VMH - núcleo ventro-medial do hipotálamo
- VP - parte ventral do pálido

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: O cérebro materno: dinâmica de interação com os filhotes.....	15
Resumo.....	16
1 Introdução.....	17
1.1 Cuidado materno.....	17
1.2 Neuroanatomia do comportamento materno.....	18
1.3 Comportamento materno em ratas.....	19
1.4 Anóxia neonatal e comportamento materno.....	21
1.5 Separação materna.....	22
2 Justificativa.....	24
3 Objetivos.....	25
4 Materiais e métodos.....	26
4.1. Obtenção dos animais.....	26
4.2 Acasalamentos e Padronização da Ninhada.....	26
4.3 Monitoramento Comportamental.....	26
4.4 Processamento do material biológico.....	30
4.4.1 Correlações dos padrões de ativação de áreas encefálicas de ratas cujos filhotes sofreram anóxia, com um ciclo de amamentação.....	30
4.4.2 Perfusão transcardíaca.....	33
4.5 Procedimentos imunoistoquímicos.....	34
4.5.1 Imunoistoquímica contra a proteína Fos.....	34
4.5.2 Coloração em Nissl.....	35
4.5.3 Análise qualitativa de neurônios c-Fos imunoreativos (IR).....	35
5. Análise estatística.....	38
6. Resultados.....	38
6.1 Resultados e discussão do monitoramento da interação da mãe com os filhotes ao longo do dia.....	38
6.2 Resultados e discussão da análise qualitativa de neurônios c-Fos imunoreativos (IR) após ciclo de amamentação de 30 minutos.....	50
7 Conclusão.....	63
CAPÍTULO II: Efeito da anóxia sobre o desenvolvimento somático e sensorio-motor dos filhotes.....	64
Resumo.....	65
1. Introdução.....	66
1.1 Desenvolvimento do sistema nervoso.....	66
2 Justificativa.....	69
3 Objetivos.....	70
4 Materiais e métodos.....	71
4.3 Análise do crescimento somático e desenvolvimento sensorio-motor.....	71
4.3.1 Medidas de crescimento somático e maturação de características físicas.....	72
4.3.2 Ontogênese de reflexos.....	74
5 Análise estatística.....	78
6 Resultados.....	78
6.2 Ontogênese de reflexos e desenvolvimento somático.....	78
7 Discussão.....	82
8 Conclusões.....	85
9 Referências Bibliográficas.....	86
10 Anexos.....	98

I CAPÍTULO:

O cérebro maternal: dinâmica de interação com os filhotes

RESUMO

Em ratas, a mudança de nulípara para multípara leva a uma série de modificações, permanentes ou não, sobre o sistema nervoso, voltadas para os cuidados pessoais e com a prole. A plasticidade cerebral que ocorre durante a prenhez, é inerente às fêmeas e é resultado de uma significativa ação hormonal sobre o SN (KINSLEY e AMORY-MEYER, 2011) que constitui em respostas adaptativas à maternidade favorecendo a capacidade de aprendizagem à nova situação em que a fêmea agora se encontra. Ratas nulíparas Wistar foram acasaladas (2:1), foram mantidas em caixas-moradia em condições padrão de biotério até dois dias antes do parto, quando foram separadas. Um dia após o parto, 8 filhotes foram selecionados e mantidos com suas mães. O comportamento materno no terceiro (n = 10) e no quinto (n = 10) dias de lactação foi monitorado continuamente por câmera filmadora SONY DCR-SR220 com *nightshot*, a qual estava acoplada diretamente a um microcomputador. O pesquisador registrou, na medida do possível, a ocorrência e o tempo gasto com cada comportamento: lambe, agrupar, amamentar (com ou sem cifo), construção de ninho, comer, beber, auto-limpeza e forrageamento. Os resultados obtidos após monitoramento de 24 h (12 h/claro e 12 h/escuro) de 5 ratas no 3º e 5º dias de lactação permite-nos inferir que o 3º dia, no ciclo claro, as ratas realizam mais comportamentos de cuidados com a prole, como agrupamento, construção de ninho e amamentação, enquanto que no ciclo escuro realizam atividades gerais próprios, como, auto-limpeza, alimentação ou ficam em descanso. Já no 5º dia de lactação, as ratas, seja no claro ou no escuro, amamentam de modo semelhante. Entretanto, quando comparamos o 5º com o 3º dia, os comportamentos de lambe e agrupar ocorrem de maneira significativamente maior. Na segunda parte do experimento, ratas foram divididas nos grupos: anóxia (A, n=10) e controle (C, n=10), conforme suas respectivas ninhadas foram submetidas à anóxia ou não no 5º dia de lactação, com o objetivo de avaliar a influência da privação de oxigênio sobre o cuidado materno durante um ciclo de amamentação de 30 min.. Após este período, os filhotes foram separados de suas mães, as quais foram anestesiadas e, os encéfalos foram processados com técnicas de imunistoquímica contra proteína c-Fos (ABC-DAB). Após insulto anóxico as mães do grupo A gastam mais tempo com os comportamentos de lambe, auto-limpeza e forragear em detrimento da amamentação, comparado as do grupo C. Houve diferença na intensidade da ativação de células fos imunorreativas durante o ciclo de 30 minutos de amamentação na MPA, PAG, Pir, VP, Tu, PH, Pe, regiões que participam de circuitos envolvidos no comportamento materno.

1 Introdução

1.1 Cuidado materno

Mamíferos recém-nascidos necessitam de cuidados maternos para sobreviver. A mãe, além de representar a principal fonte de alimento, calor e proteção, ela também fornece estímulos táteis, olfatórios e auditivos essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal de sua prole (KUHN; SCHANBERG, 1998). O modo como uma mãe satisfaz as necessidades de seus filhotes e a respostas desses aos estímulos maternos comprovam a existência de um sistema altamente integrado e desenvolvido em prol de um fim comum. Em várias espécies, logo após o parto, a mãe lambe o líquido amniótico e o sangue remanescentes. A frequência desse comportamento de lambar é mais voltada para região anogenital, que é essencial para estimular a micção. Substâncias químicas atrativas na urina dos filhotes parecem recompensar à mãe pelo bom desempenho (HRDY, 1999).

Na maioria das espécies de mamíferos, as fêmeas apresentam um comportamento típico de esquia em relação aos animais jovens, entretanto, ao final de gestação e no período do parto elas mudam esse comportamento e passam a se interessar pelo recém-nascido: a limpeza dos filhotes e a ingestão dos fluidos amnióticos e dos restos placentários são comportamentos generalizados entre as ordens de mamíferos; a vocalização realizada pela mãe, além de aproximá-la de sua prole, protege-a de predadores; e a amamentação, o comportamento materno mais comum presente em mamíferos logo após o parto (NUMAN, 2003).

O cuidado materno é um comportamento específico de cada espécie, sendo determinado por modificações fisiológicas que ocorrem antes e imediatamente após o parto (NUMAN, 1994). Durante este período particular, o principal objetivo das fêmeas é assegurar a própria sobrevivência e a dos filhotes. Com esta finalidade, muitos outros comportamentos são inibidos e as fêmeas dedicam-se quase que integralmente a sua prole. A dramática transição na resposta materna que ocorre entre o acasalamento e o aleitamento é uma das mais marcantes modificações comportamentais que ocorre em animais adultos (LONSTEIN et al., 2003).

As mudanças comportamentais que a mãe sofre são consequências das dramáticas alterações hormonais que ocorrem durante a prenhez e no parto. Tais alterações resultam no estabelecimento de novas conexões dendríticas e arborização (PASCUAL-LEONE et al.,

2005) que levam a uma plasticidade neuroquímica e morfológica no sistema nervoso central (SNC). Além de expressar o comportamento maternal para com a prole, a fêmea lactante precisa avaliar os riscos e em geral buscar alimentos, viabilizando assim a sua sobrevivência e a de seus filhotes. Assim, uma forte pressão evolutiva ocorre sobre as fêmeas selecionando aquelas que melhor conseguem exercer este equilíbrio (KINSLEY et al., 1999).

1.2 Neuroanatomia do comportamento materno

A área pré-óptica medial (MPA), localizada na parte rostral do hipotálamo, e o núcleo “bed” da estria terminal (BST) originam os circuitos neurais que regulam especificamente o comportamento materno (NUMAN; INSEL, 2003). Lesões eletrolíticas, neuroquímicas, por radiofrequência e, ainda, cortes com instrumentos pérfuro-cortantes nessa região rompe as conexões laterais e anteriores da MPA e prejudicando drasticamente o comportamento maternal em ratos (MICELI et al., 1983; NUMAN, 1974; NUMAN; CALLAHAN, 1980; NUMAN; CORODIMAS, 1985; NUMAN et al., 1988; NUMAN et al., 1977). A maioria dos estudos relata que os comportamentos mais prejudicados ou completamente inexistentes quando lesões acometem a MPA são os de construção de ninho e busca de filhotes. Outros estudos reportam uma severa eliminação, próxima do total, de todos os componentes do comportamento materno, inclusive a amamentação (NUMAN, 2006).

O início desse comportamento está intimamente relacionado a ação de opióides na MPA durante a lactação (FELICIO et al., 1991; MANN et al., 1995; MIRANDA-PAIVA et al., 2003, 2007; TEODOROV et al., 2006). A administração de morfina de maneira sistêmica ou local na MPA interrompe o comportamento materno durante a lactação e, esse efeito pode ser revertido pelo tratamento com naloxona, um antagonista opióide (BRIDGES; GRIMM, 1982; RUBIN; BRIDGES, 1984). Ademais, já foi demonstrado em ratos que os níveis endógenos de opióides e dos receptores de opióides na MPA estão reduzidos durante a lactação (HAMMER; BRIDGES, 1987).

É conhecido o papel da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na modulação da transmissão sensorial nociceptiva (BESSON et al., 1991; LOVICK, 1993; BANDLER; SHIPLEY, 1994), na regulação do sistema cardiovascular (LOVICK, 1993; BANDLER; SHIPLEY, 1994), na vocalização (JÜRGENS, 1994) e, na expressão de uma variedade de comportamentos como, o defensivo (BANDLER; SHIPLEY, 1994; KEAY; BANDLER, 2001), o sexual (SAKUMA; PAFF, 1979) e o maternal (LONSTEIN; STERN, 1997, 1998). A

ativação da PAG é importante para o reflexo postural de amamentação ou cifose. Lesões na parte ventro-lateral caudal da PAG de ratas lactantes reduzem drasticamente a expressão de cifose. Essa região apresenta forte expressão da proteína c-fos em consequência do estímulo de sucção (LONSTEIN; STERN, 1998, 1999). Miranda-Paiva et al. (2003) demonstraram que a PAG pode ser a responsável pela inibição do comportamento maternal em fêmeas tratadas com baixas doses de morfina (3 mg/kg, por via intraperitoneal). Utilizando este procedimento farmacológico, certo nível de ativação induzida por morfina na parte lateral da PAG é capaz para inibir o comportamento maternal. Injeções prévias de naloxona nesta área bloqueiam a inibição desse comportamento. Interessantemente, esses animais, além de não cuidarem dos filhotes, apresentaram padrões de ativação neuronal similares àqueles observados durante os comportamentos de predação e forrageamento (COMOLI et al., 2003). Sob circunstâncias naturais, um dado comportamento pode ser inibido para favorecer a expressão de outro de maior valor adaptativo (SUKIKARA et al., 2007). Existe forte relevância funcional da parte lateral da PAG na mudança do comportamento de cuidar da prole para o de caçar insetos (SUKIKARA et al., 2006; 2008). O importante trabalho realizado por Sukikara et al. (2006), sustenta a primeira evidência de que a PAG funciona também como um centro para seleção de respostas comportamentais adaptativas.

1.3 Comportamento maternal em ratas

O comportamento maternal de ratas consiste em cuidados diretos, tais como busca, amamentação e limpeza dos filhotes, e indiretos, como agressividade e construção do ninho, apresentados pela fêmea para viabilizar a sobrevivência do neonato. À medida que este se desenvolve e torna-se independente, a expressão do comportamento maternal das fêmeas diminui. Assim, está bem estabelecido que os parâmetros característicos do comportamento maternal de ratas como, por exemplo, busca dos filhotes, agrupamento dos mesmos e permanência da rata sobre a ninhada em postura apropriada à amamentação, são mais intensos na primeira semana após o nascimento da prole do que nas semanas seguintes, quando os filhotes vão se desenvolvendo e adquirindo habilidades para assegurar sua própria sobrevivência (NUMAN, 1994).

O surgimento e a manutenção do comportamento maternal são controlados pela interação de fatores ambientais, bioquímicos, hormonais e neurais (NUMAN, 1994). A drástica alteração hormonal que ocorre ao final da gestação e no período pré-parto é

caracterizada pela redução nos níveis de progesterona que foram elevados ao longo da gestação, seguido por aumento nos níveis de estradiol (ATKINSON; WADDELL, 1995). Essa mudança no equilíbrio dos hormônios esteróides induz a um considerável aumento nos níveis de prolactina, 24 - 48 horas antes do parto, aumento este que será mantido durante a lactação como resultado do estímulo de sucção (CHAMLEY et al., 1973; BRIDGES; GOLDMAN, 1975). Tais modulações são necessárias para o estabelecimento e a expressão desse importante comportamento (NUMAN, 1994).

Os comportamentos de busca de filhotes e de construção de ninho são indicativos de comportamentos motivacionais maternos (STERN, 1996). A busca por filhotes envolve uma sequência complexa de reflexos. A entrada de um estímulo sensorial trigeminal permite que através do contato com o foçinho do filhote ocorra a abertura da boca materna, através do abaixamento da mandíbula. Uma vez na boca, o filhote é eficientemente transportado para o ninho, onde é rapidamente depositado (JACQUIN; ZIEGLER, 1983). Alguns estudos sugerem que o comportamento de busca representa uma resposta voluntária da mãe em relação ao estímulo dos filhotes, enquanto a amamentação pode ser transitoriamente ativada como reflexo quando a mãe, vagando pela caixa-moradia, aproxima-se dos filhotes e eles posicionam-se abaixo dela (STERN, 1996), começando assim, a sucção. A estimulação da sucção pelos filhotes estimula a expressão do comportamento maternal em ratas por promover a postura de cifose (STERN et al., 2002).

A lactação desempenha um papel crítico na sobrevivência dos mamíferos. É um evento intermitente, em que as mães devem caçar para sua própria sobrevivência e, simultaneamente, fornecer um alimento enriquecido, o leite, a sua prole e, assim, será suprida a demanda. Durante a lactação, um laço é formado entre a mãe e os filhotes, o que favorece a sua proteção e desenvolvimento social. Talvez uma vantagem importante na evolução da lactação é o potencial que uma mãe tem em influenciar significativamente a desenvolvimento social de sua prole (FLEMING et al., 2002). Um nobre exemplo disso é a descoberta de que os comportamentos maternos que ocorrem naturalmente, como lambar, limpar e a postura de cifose durante a lactação levou a uma transmissão não genômica desses comportamentos individuais ao longo gerações (FRANCIS et al., 1999).

1.4 Anóxia neonatal e comportamento materno

A anóxia neonatal, a qual é considerada um grave problema clínico, é uma das mais importantes causas de lesão encefálica em recém-nascidos humanos. Tais lesões podem ter graves e duradouras consequências, incluindo retardo mental, paralisia cerebral, epilepsia, deficiência visual e auditiva, bem como déficit motor e comportamental (BIAGAS, 1999; BRIDGES, 1996).

Diferentes espécies de mamíferos têm sido estudadas para tentar elucidar os mecanismos patogênicos que culminam em eventos hipóxico-isquêmicos que trazem danos ao cérebro (ROOHEY; RAJU, 1997; VANNUCCI, 1993). Alterações neuroquímicas e comportamentais têm sido identificadas e os efeitos a curto prazo envolvem morte celular em neurônios do córtex frontal, striatum e cerebelo oito dias após indução da asfixia (DELL'ANNA et al., 1997) e aumento dos níveis de dopamina no mesencéfalo e telencéfalo (CHEN et al., 1997). A longo prazo, as modificações envolvem o sistema dopaminérgico (CHEN et al., 1995; EL-KHODOR; BOKSA, 1998) e o padrão de mielinização (KOHLHAUSER et al., 2000). Evidências indicam o papel da dopamina no início e na manutenção do comportamento materno (BRIDGES, 1996; CHEN et al., 1997; KEER; STERN, 1999; STERN, 2000). Atividade reduzida ou excessiva dopaminérgica tem mostrado atuar negativamente com o comportamento materno (STERN, 2000).

É bastante conhecido o papel dos neurotransmissores sobre a plasticidade do SN (BERGER-SWEENEY; HOHMANN, 1997). Assim, alterações nos sistemas monoaminérgicos durante o desenvolvimento precoce têm sido associadas a transtornos neurológicos e psiquiátricos, tais como, autismo, retardo mental e depressão (GU, 2002). A hipótese de que os neurotransmissores apresentam funções de não transmissão durante o desenvolvimento é decorrente da presença precoce dessas substâncias durante as fases da embriogênese. Tais substâncias atuam alterando o metabolismo, a síntese e as interações entre os receptores podendo, assim, levar a modificações no desenvolvimento embriológico (BUZNIKOV, 1996; LAUDER et al., 1981; LAUDER; ZIMMERMAN, 1988).

As alterações que acometem o SN ao nascimento após hipóxia são parcialmente decorrentes do insulto hipóxico aos neurônios, porém é possível que algumas modificações que ocorram no SN em modelos de ratos após hipóxia, durante o parto, sejam mediadas por variações nos cuidados maternos voltados a prole (ZHANG et al., 2005).

Importantes grupos de pesquisas indicam que o cuidado materno exerce duradouro impacto sobre o desenvolvimento do cérebro e comportamento da prole. Em ratos, as variações naturais que ocorrem nos comportamentos maternos de lambar e limpar das mães com cada filhote individualmente demonstraram sofrer influência dopaminérgica e de respostas ao estresse da glândula supra-renal ao eixo hipotálamo-hipófise (ZHANG et al., 2005; MEANEY, 2001; BREDY et al., 2003; WEAVER et al., 2002; MENARD et al., 2004).

Assim, existem algumas semelhanças claras entre alterações causadas no SNC pela hipóxia ao nascimento e por variações no cuidado materno, levantando a possibilidade de que alterações consequentes à hipóxia ao nascimento podem ser mediadas por alterações nos cuidados maternos da prole hipóxica. No modelo de hipóxia ao nascimento de ratos, as diferenças nos cuidados maternos das mães são geralmente controladas pelo cruzamento de ninhadas (*cross-fostering*). Entretanto, os cuidados maternos podem ser influenciados por características dos filhotes, tais como temperatura, níveis de atividade e vocalização (JANS; LEON, 1983). No parto cesariano ou quando há hipóxia ao nascimento ocorre redução da atividade locomotora do filhote bem como da vocalização ultrasônica nas primeiras semanas de vida (EL-KHODOR BF; BOKSA, 1997; CALAMANDREI et al., 2004), fatores estes que prejudicam a interação mãe-filhote ao nascimento.

1.5 Separação materna

Em filhotes de ratos com 2 semanas de vida, a separação materna é imediatamente acompanhado por redução de 40% nas taxas cardíacas e respiratórias durante as primeiras 12-16 horas de separação, apesar da manutenção de temperatura do corpo (HOFER, 1970). As consequências a longo prazo da perturbação da interação mãe-filhotes varia desde uma marcada supressão de sistemas neuroendócrinos específicos após curtos períodos de privação materna, até retardos do crescimento e desenvolvimento comportamental após períodos crônicos (KUHN; SCHANBERG, 1998).

A interação mãe-filhotes que ocorre durante o início da vida permite a programação das respostas ao estresse nos descendentes (LIU et al., 1997; CALDJI et al., 1998; FRANCIS; MEANEY, 1999). Longos períodos de separação diária a partir da mãe (isto é, 3-6 h) aumentam as respostas comportamentais, neurais e respostas endócrinas ao estresse, que persistem durante toda a vida, devido a alterações no desenvolvimento e na regulação de

neurônios em orquestrar a resposta ao estresse, especialmente ao nível do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH) (FRANCISCO; MEANEY, 1999). Os mecanismos subjacentes a respeito dos efeitos da separação materna sobre desenvolvimento do SNC ainda é um assunto de muitos questionamentos (MACRI et al, 2004), no entanto, os efeitos da separação materna sobre a resposta ao estresse tem importantes implicações clínicas, uma vez que a capacidade de responder diferentemente pode afetar os resultados de saúde em condições de estresse (SECKL; MEANEY, 1993; FRANCIS; MEANEY, 1999), e contribuir para o desenvolvimento de uma ampla variedade de transtornos psicológicos e fisiológicas, tais como, hipertensão, asma, estados de pânico e ansiedade, depressão e distúrbios do sono (HERMAN; CULLINAN, 1997;. RIETVELD et al., 1999). Embora estes achados reforcem mais uma vez a importância do período neonatal para o desenvolvimento do SNC, várias observações nos trouxe a hipótese de uma ligação entre a separação materna neonatal e distúrbios respiratórios.

2 JUSTIFICATIVA

A obtenção do melhor equilíbrio entre subsistência e reprodução é um dos desafios mais importantes para as fêmeas de mamíferos. Para tal é preciso que fatores como perigos do meio ambiente e disponibilidade de alimentos sejam considerados e na medida do possível, antecipados alta probabilidade de acerto. Assim, uma forte pressão evolutiva ocorre sobre as fêmeas selecionando àquelas que melhor conseguem exercer este equilíbrio. Durante a prenhez e logo após o parto, o cérebro passa por importantes ajustes com modificações sensoriais e cognitivas decorrentes de adaptações na intensidade de ativação de circuitos e formação de novas conexões. Além de expressar o comportamento maternal para com a prole, a fêmea lactante precisa avaliar os riscos e em geral buscar alimentos, viabilizando assim a própria subsistência.

Essa primeira parte do trabalho pretende descrever os eventos do comportamento materno em ratas ao longo de 24 h comparando período claro e escuro do dia e, ainda se há diferenças nos eventos comportamentais entre o terceiro e quinto dias pós-natais.

3 OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo geral investigar o comportamento maternal durante o aleitamento e o padrão de ativação dos neurônios em áreas encefálicas relacionadas aos cuidados maternos de ratas cujos filhotes sofreram anóxia no período do aleitamento.

Os objetivos **específicos** deste estudo foram:

- ✓ Analisar os seguintes comportamentos maternos básicos através da interação mãe-filhotes no 3º e 5º dias de lactação:
 - Lamber, agrupar, amamentar sem cifo, cifo, auto-limpeza, construção de ninho, parada, forrageamento, comer e beber.
- ✓ Analisar o padrão de ativação de áreas encefálicas relacionadas ao comportamento materno no 5º dia de lactação de ratas cujos filhotes sofreram anóxia.
 - Distribuição de neurônios Fos-imunoreativos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos Animais

Foram utilizadas ratas nulíparas (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com aproximadamente 90 dias de idade, mantidas no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno medindo 30 x 40 x 18 cm, em salas com sistema de temperatura constante ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo de luz de 12 h, claro e escuro (06h00 – 18h00). Água e comida foram fornecidas *ad libitum* durante todos os experimentos. Todos os esforços são feitos para reduzir o sofrimento e o número de animais utilizados. Os procedimentos descritos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta universidade (Protocolo nº 134, fls. 38 do livro 2).

4.2 Acasalamentos e Padronização da Ninhada

No final do período claro do dia, 2 ratas foram colocadas na gaiola de um macho sexualmente experiente para o acasalamento. Os animais pertenciam a ninhadas distintas de maneira que foi anulada a possibilidade de cruzamentos de irmãos. Logo no início do período claro do dia seguinte é realizada a análise de citologia vaginal para confirmar a presença de espermatozoides no lavado vaginal, considerando este o dia 1 da prenhez. As ratas foram mantidas na mesma gaiola, sendo separadas a poucos dias do parto. As ocorrências de nascimentos foram monitoradas diariamente até às 14h00. Após este horário, os partos foram considerados como tendo ocorrido no dia seguinte.

Ao final, 20 fêmeas prenhes foram obtidas. Um dia após o parto (o dia do nascimento foi considerado como dia zero), 8 neonatos (4 machos e 4 fêmeas) foram selecionados e mantidos com suas mães para amamentação.

4.3 Monitoramento Comportamental

Caixa Experimental

A caixa experimental foi confeccionada com material de acrílico para visualização e filmagem do comportamento dos animais a serem testados. Ela é composta por vários orifícios para passagem de ar e possui as seguintes medidas: 60 x 40 x 35 cm. Um dia antes do teste comportamental as mães foram colocadas na gaiola experimental para habituação por

30 min. No dia do teste, as ratas foram transferidas para gaiola experimental junto com seus filhotes e parte da mesma maravalha da gaiola-moradia. A quantidade de maravalha transferida foi menor que a existente na gaiola-moradia, para que os parâmetros comportamentais avaliados pudessem ser observados nitidamente. Entretanto, não impossibilitava a rata de realizar a construção do ninho.

Parâmetros comportamentais avaliados

O acompanhamento do comportamento foi realizado continuamente por câmera filmadora SONY DCR-SR220 com *nightshot*, a qual estava acoplada diretamente a um microcomputador (Figura 1), no terceiro (n = 10) e quinto (n = 10) dias de lactação e, gravado para posterior análise detalhada.



Figura 1. Sistema de monitoramento diário do comportamento materno de ratas.

O pesquisador registrou, na medida do possível, a ocorrência e o tempo gasto com cada comportamento. Tais comportamentos consistem em cuidados diretos, tais como, lambe, agrupar, amamentar, cifose ou indiretos, como construção do ninho e forrageamento. Ainda foram avaliados comportamentos gerais da mãe, como *self-grooming*, alimentação e atividades gerais ao longo dos dias. A maneira de avaliação dos parâmetros está descritos abaixo.

Lamber – Avalia-se quanto tempo a rata lambe os filhotes.

Agrupar - Avalia-se quanto tempo a rata agrupa os filhotes.

Amamentar sem cifose – Avalia-se quanto tempo a rata permanece amamentando sem estar na posição de cifose.

Cifose – Avalia-se quanto tempo a rata permanece amamentando na posição de cifose fisiológica (coluna arqueada) com todos os filhotes agrupados. Quando este tempo é igual ou superior a 3 minutos consecutivos, temos a manifestação do comportamento maternal total (*Full Maternal Behavior, FMB*).

Auto-limpeza – Avalia-se quanto tempo a rata permanece fazendo comportamento de limpeza nela mesma.

Construção de ninho – Avalia-se quanto tempo a rata permaneceu preparando o ninho para os filhotes.

Parada – Avalia-se quanto tempo a rata permanece parada, em descanso.

Forrageamento – Avalia-se quanto tempo a rata apresentou comportamento exploratório da caixa.

Comer – Avalia-se quanto tempo a rata permaneceu comendo ração.

Beber – Avalia-se quanto tempo a rata permaneceu bebendo água.

Exemplos de comportamentos são mostrados nas figuras 2 e 3.

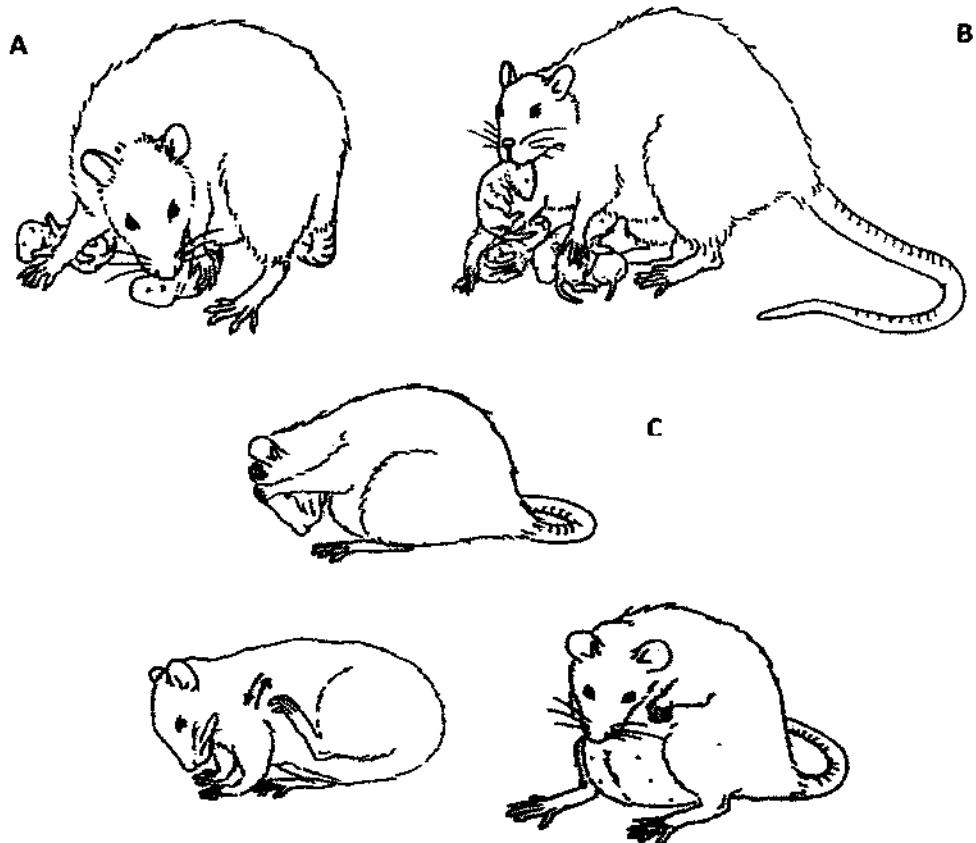


Figura 2. Parâmetros de comportamento materno em ratas. (A) lamber filhotes; (B) busca de filhotes; (C) auto-limpeza. (RONCA et al., 1993).

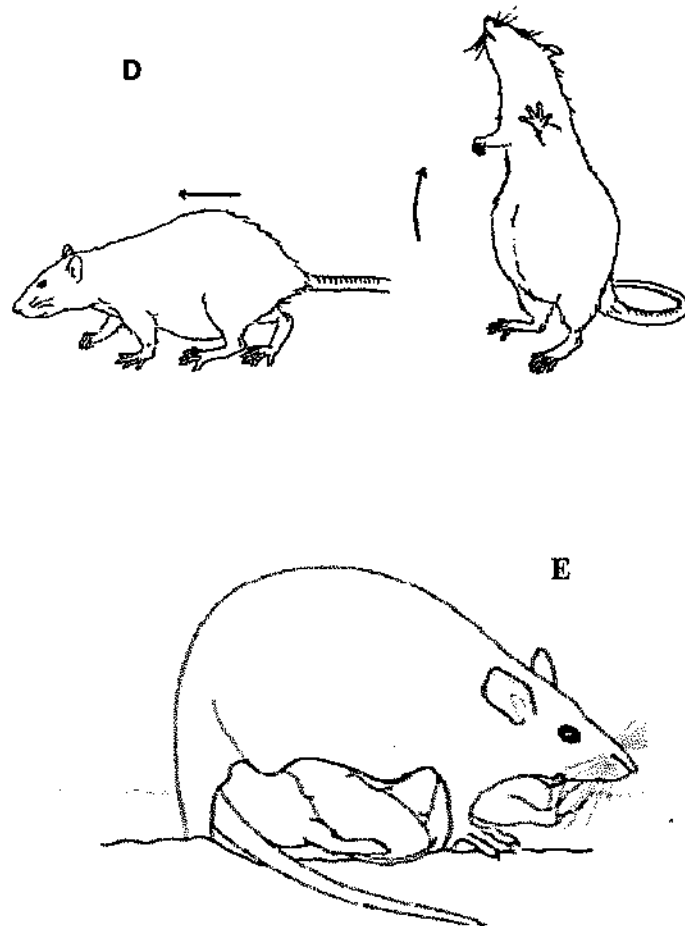


Figura 3. Parâmetros de comportamento materno em ratas. (D) forragear; (RONCA et al., 1993); (E) cifo. (STERN et al., 2002).

Os parâmetros comportamentais foram avaliados por meio de *software* específico para análise de comportamentos, EthoLog 2.2 (OTTONI, 2000) (Figura 4).



Figura 4. Sistema de análise de comportamentos. A figura ilustra à esquerda o programa EthoLog com os parâmetros avaliados categorizados. À direita, o vídeo obtido. (Fotografia: Renata de Vasconcelos).

4.4 Processamento do material biológico

4.4.1 Correlações dos padrões de ativação de áreas encefálicas relacionadas ao comportamento materno de ratas cujos filhotes sofreram anóxia, com um ciclo de 30 minutos de amamentação.

No 5º dia de lactação, cinco (5) ratas tiveram suas respectivas ninhadas submetidas à anóxia. Foram utilizados neonatos machos e fêmeas (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), no 5º dia de lactação. Os animais foram divididos nos grupos: anóxia e controle.

Para a exposição dos animais à anóxia, utilizou-se sistema construído e validado em nosso laboratório (TAKADA, 2009; TAKADA et al., 2011), constituído por câmara semi-hermética de policarbonato (31 × 14 × 19,5 cm), com entrada e saída de gás, acoplada a manômetro, fluxômetro e a cilindro de nitrogênio gasoso. A câmara semi-hermética previne o aumento de pressão no interior da câmara, fazendo com que seja o mais próximo possível da pressão atmosférica. Com o objetivo de evitar hipotermia e potencializar os efeitos da anóxia, a temperatura da câmara foi mantida entre 35 e 37 °C pela imersão parcial da mesma em água aquecida por resistência elétrica (Figura 5). Esta faixa de temperatura é importante uma vez que a temperatura basal dos neonatos é de 33 °C, constituindo por si só fator de neuroproteção (CAPUTA et al., 2005; ROGALSKA et al., 2006).

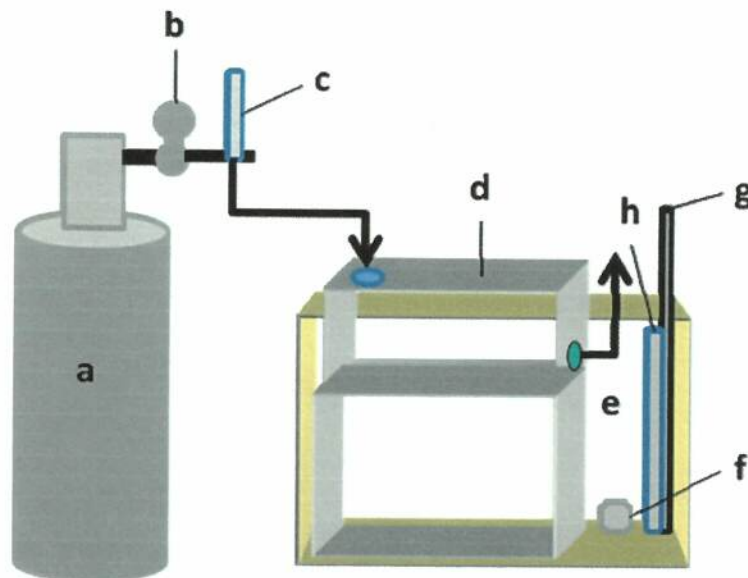


Figura 5. Sistema utilizado para provocar anóxia em ratos neonatos. Desenho esquemático mostrando: a - cilindro de nitrogênio gasoso (concentração de 100%); b - manômetro; c - fluxômetro; d - câmara em policarbonato parcialmente imersa na água; e - cuba em vidro transparente com água aquecida; f - bomba difusora de água (para homogeneizar a temperatura da água); g - termômetro; h - resistência para aquecimento da água. Fonte: TAKADA et al., 2011.

Para a anóxia, a câmara higienizada anteriormente com álcool 70 % (entre uma ninhada e outra este procedimento foi repetido), foi saturada completamente com nitrogênio 100% a um fluxo de 3L/minuto e pressão próxima à pressão atmosférica (aproximadamente 101,7 kPa), determinados de acordo com a literatura (TANG; NAKAZAWA, 2005; ROGALSKA et al., 2006; COQ et al., 2007). Os animais foram então colocados rapidamente na câmara, permanecendo durante 19 minutos nestas condições, tempo este considerado o máximo para não ocorrer morte massiva dos neonatos (DELL'ANNA et al., 1995b). Testes prévios realizados neste laboratório mostraram que períodos ligeiramente maiores causaram alto índice de mortalidade (DL50 = 30 minutos). Os casos de canibalismo observado foram irrelevantes. Para o período considerado, o índice de mortalidade foi de 9,43%, semelhante ao observado em literatura com modelos parecidos (DELL'ANNA et al., 1991; IUVONE et al., 1996). Após a recuperação dos animais (recuperação da coloração, da respiração e da movimentação ativa), que ocorreu em média 5 minutos após a retirada da câmara, estes foram

devolvidos para a mãe, durante 30 minutos. Em seguida, os filhotes foram separados de suas mães, as quais foram submetidas à perfusão transcardíaca.

O grupo controle foi exposto às mesmas condições experimentais, sem, contudo haver troca do ar dentro da câmara, ou seja, permaneceram ao ar ambiente.

4.4.2 Perfusão transcardíaca

No 5º dia de lactação, cinco (5) ratas tiveram suas respectivas ninhadas submetidas à anóxia, como descrito anteriormente, e depois foram anestesiadas com associação anestésica composta por: acepromazina (2,5 mg/kg)¹; xilazina (10 mg/kg)²; cetamina (75 mg/kg)³, e perfundidos por via transcardíaca. Para a perfusão, o animal foi posicionado em superfície apropriada com imobilização da cabeça. Esta foi realizada com um suporte específico que permitisse a deposição de gelo sobre a cabeça do animal durante o período da passagem do fixador (NOGUEIRA et al., 1997). Para o acesso ao ventrículo esquerdo, onde foi introduzida uma cânula para perfusão, foi realizado inicialmente um corte na parede do abdome expondo-se assim, o processo xifóide. Este foi realizado em forma de “V” na musculatura e nas costelas, permitindo assim, a exposição do coração na cavidade torácica. Para impedir que a perfusão alcançasse a aorta descendente e, como consequência toda sua área de irrigação, o pulmão esquerdo foi afastado e a aorta descendente pinçada com pinça hemostática tipo Keller. Em seguida, uma cânula acoplada a uma bomba peristáltica⁴ foi introduzida no ventrículo esquerdo do coração e presa na área por uma pinça Keller. A bomba foi acionada em velocidade compatível com a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. Inicialmente foram infundidos 150 ml de solução salina (NaCl, 0,9%) a temperatura ambiente para remoção do sangue de dentro dos vasos. Este procedimento previne a formação de coágulos e propicia a correta penetração do fixador nos tecidos. A perfusão com salina foi seguida da infusão de solução fixadora (4% de paraformaldeído em 4% de bórax, pH 7,4, a 4º C). Quando foi observada a contração dos membros superiores, sinal da chegada do fixador nesta região, imediatamente, foi colocado gelo sobre a cabeça do animal, para minimizar a degradação protéica.

Ao final da passagem do fixador, os encéfalos foram retirados do crânio, e pós-fixados na mesma solução fixadora acrescida de sacarose (20 %) durante 4 horas. Após esse período, foi

¹ Acepromazina, Univet, Brasil

² Xilazina, Syntec, Brasil

³ Ketamina, Syntec, Brasil

⁴ Masterflex, Cole-Parmer, Niles, IL, EUA

armazenado em solução crioprotetora (tampão fosfato – PBS – acrescido de sacarose 20 %) por um período de 6-24 h. Os encéfalos foram crio-seccionados em cortes coronais de 40 µm de espessura, utilizando-se criomicrotomo de congelamento⁵. Cinco séries de cortes foram coletadas para cada animal em placa de acrílico (25 cavidades) com solução anticongelante e armazenadas a -20° C.

4.5 Procedimentos imunoistoquímicos

Uma série de cortes de cada animal (n = 5) foi submetida à reação de imunoistoquímica contra a proteína c-fos.

4.5.1 Imunoistoquímica contra a proteína Fos.

A detecção imunoistoquímica da proteína Fos tem se revelado um método bastante valioso para analisarmos as populações neurais particularmente mobilizadas frente a uma dada condição comportamental (MORGAN; CURRAN, 1991). Após noventa minutos do início do teste comportamental, quando temos o pico da expressão da proteína Fos (MORGAN; CURRAN, 1991), as mães foram submetidas à perfusão transcardíaca, descrita anteriormente e, foi avaliada a expressão da proteína Fos.

Uma série de cortes de cada animal foi submetida à reação de imunoistoquímica para detecção da proteína c-fos. Ao serem removidos da solução anti-congelante onde estavam armazenados, os cortes foram lavados em tampão fosfato de potássio (KPBS, 3 x 10 min). Em seguida foram imersos durante 30 min em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 0,3 %), Triton⁶ (0,3 %), e KPBS, e depois foram submetidos a 3 lavagens de 10 min. em KPBS. A seguir, foram incubados por 40 min. em solução “blocking” (1:33) contendo KPBS, Triton (0,3 %), e soro normal de cabra⁷ (NGS 5 %). Após esse período, foi pipetado nesta solução “blocking” o anticorpo primário anti-c-Fos (AB-5)⁸ (diluição 1:10.000) e a incubação foi de 48 h. Durante a incubação os cortes permaneceram em recipientes de 1,5 mL, posicionados em agitador protegido da luz. Após a incubação, os cortes foram submetidos a lavagens em KPBS (3 x 10 min) e, posteriormente, incubados em solução com anticorpo secundário, feito em cabra contra coelho, por 90 min. Esta solução foi composta por Triton (0,3 %), KPBS e anticorpo secundário⁹

⁵ SM 2000 R, Leica, Alemanha

⁶ Amresco, Sólton, OH, EUA

biotinilado (diluição 1:1000). Os cortes foram novamente submetidos a lavagens com KPBS (3 x 10 min) e outra incubação (90 min) com complexo avidina-biotina-peroxidase¹⁰ 1%. A seguir, os cortes foram submetidos a lavagens em KPBS (3 x 10 min). Por fim, foi realizada, por 5 minutos, a reação de imunoperoxidase com 3,3-diaminobenzidina (DAB)¹¹, diluído em solução KPBS 0,02 M, níquel sulfato de amônio (NAS)¹² e peróxido de hidrogênio¹³ (H₂O₂). Assim, os cortes foram incubados até que obtivessem a cor marrom claro / púrpura. Após esta reação, os cortes foram submetidos a lavagens em KPBS (3 x 10 min).

Depois de montados em lâminas previamente gelatinizadas¹⁴, os cortes foram submetidos ao processo de desidratação em concentrações crescentes de álcoois (50 %, 70 %, 95 %-I, 95 %-II, 100 %-I, 100 %-II, 100 %-III, 3 min cada) e diafanização em xilol (xilol-I, 3 min, xilol-II, 30 min). Após secagem, as lâminas foram recobertas com DPX¹⁵ e lamínula.

4.5.2. Coloração em Nissl

Os cortes foram desidratados, iniciando-se com a água seguida por uma sequência crescente de concentrações de álcoois (50 %, 70 %, 95 %-I, 95 %-II – 3 min em cada; 100 %-I, 100 %-II, 100 %-III – 5 min em cada), diafanizados em xilol (xilol-I, 5 min, xilol-II, 10 min) e, novamente hidratados do xilol (xilol-I -3 min) até a água, passando pelas imersões em concentrações decrescentes de álcoois (100 %-III, 100 %-II, 100 %-I - 3 min em cada; 95 %-II, 95 %-I, 70 %, 50 % - 2 min em cada). A seguir, os cortes foram imersos em tionina¹⁶ (20 segundos) e, após este, foram mergulhados em água destilada para retirada do excesso de corante. Os cortes foram submetidos à nova desidratação, da água até o xilol, 3 min em cada, para posterior montagem com DPX e lamínula.

⁷ Chemicon International, Inc., EUA

⁸ Anti c-Fos (AB-5), Calbiochem, Inc. CA, USA

⁹ Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

¹⁰ ABC Kit Vectastain Elite Standard, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

¹¹ Merk Laboratories, Darmstadt, Alemanha

¹² Sigma, St Louis, MO, EUA

¹³ Labsynth, Diadema, SP, BRASIL

¹⁶ Fisher scientific

¹⁴ Gelatina – Sigma, St Louis, MO, EUA

¹⁵ BDH Laboratories Supplies, Poole, England

4.5.3. Análise qualitativa de neurônios c-Fos imunoreativos (IR)

Para determinar núcleos e regiões a serem submetidas à contagem de neurônios c-Fos-IR, foi realizada, inicialmente, uma análise qualitativa dos cortes, para identificar a distribuição da marcação neuronal. A análise histológica foi realizada em microscopia de campo claro (E-1000, Nikon Eclipse Corporation), e câmera digital¹⁷ para um microcomputador, utilizando-se objetiva com aumento de 10 x, e o *Atlas of the developing rat nervous system* (PAXINOS et al., 1994) e de uma série corada com tionina, método de Nissl.

O número de neurônios c-Fos-IR em uma área retangular pré-determinada foram quantificados através do método de contagem manual com auxílio de *software* específico para análise de imagem¹⁸ considerando a seguinte padronização:

+: de 1 a 10 neurônios c-Fos-IR (baixa densidade)

++ : de 11 a 20 neurônios c-Fos-IR (média densidade)

+++ : mais de 21 neurônios c-Fos-IR (alta densidade)

Foram considerados apenas os neurônios c-Fos-IR que apresentaram núcleo com formato oval ou elipsóide, com marcação evidente preta ou marrom-escura (Figura 6).

¹⁷ Nikon, DXM 1200F

¹⁸ Image Pro-Plus, version 5.1, Media Cybernetics, Silver Spring, MA, EUA

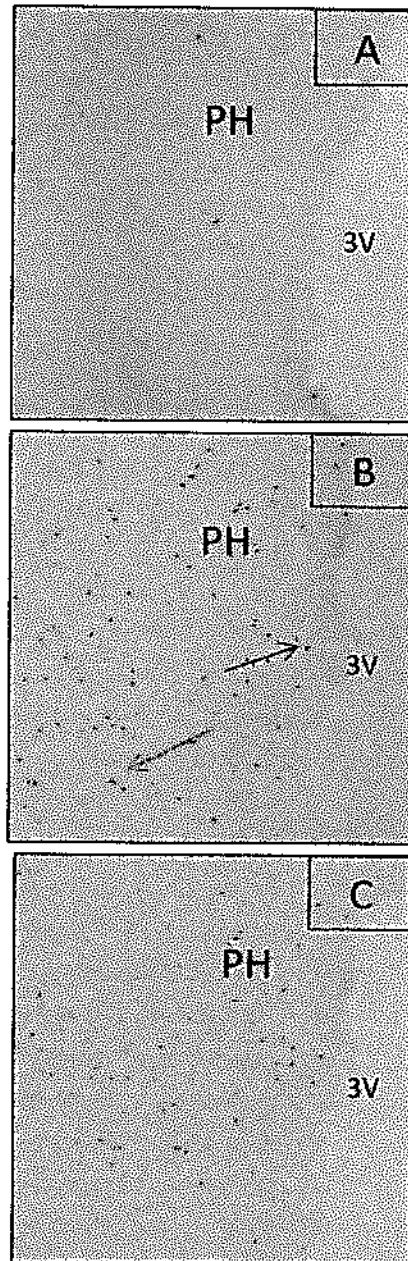


Figura 6. Padrão de contagem e avaliação qualitativa. Fotomicrografias em campo claro (200 μ m) evidenciando a imunoreatividade a Fos e o critério utilizado para padronização da análise qualitativa: (A) +: de 1 a 20 neurônios c-Fos-IR; (B) ++: de 11 a 20 neurônios c-Fos-IR; (C) +++: mais de 21 neurônios c-Fos-IR; seta preta: neurônios c-Fos-IR considerado na contagem; seta vermelha: neurônios c-Fos-IR não considerado na contagem. 3V: terceiro ventrículo; PH: área hipotalâmica posterior.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o teste t-Student's para as comparações do tempo gasto com os comportamentos maternos. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão ($X \pm DP$). O nível de significância foi de $p \leq 0.05$.

6 RESULTADOS

Experimento 1: "Monitoramento da interação da mãe com os filhotes ao longo do dia."

Ratas em lactação foram monitoradas por uma câmera de vídeo durante 24 horas e toda a interação com os filhotes foi registrada e analisada no terceiro ($n = 10$) e no quinto ($n = 10$) dias de lactação, sendo 12 horas durante o período claro do dia (06h00 - 18h00) e 12 horas no período do escuro (18h00 -- 06h00).

6.1 Resultados e discussão do Experimento 1

Em ratas, a mudança do período de nulípara para múltipara leva a uma série de modificações, permanentes ou não, sobre o sistema nervoso (SN), voltadas para os cuidados pessoais e com a prole. A plasticidade cerebral que ocorre durante a prenhez, é inerente às fêmeas e é resultado de uma significativa ação hormonal sobre o SN (KINSLEY; AMORY-MEYER, 2011) estimulada ainda pela presença dos filhotes (FLEMING; CORTER, 1988; FLEMING, 1986; NUMAN, 1988; PEDERSEN, 1995; STERN, 1997) que constitui em respostas adaptativas à maternidade favorecendo a capacidade de aprendizagem à nova situação em que a fêmea agora se encontra.

Em condições naturais, os eventos hormonais relevantes ocorrem na segunda semana da gestação e inclui o aumento dos níveis de estrógeno, o qual é essencial para o início do comportamento materno (ROSENBLATT, 1994; BRIDGES, 1996). O aumento do estrógeno e a conseqüente expressão do comportamento materno (ROSENBLATT, 1994; NUMAN, 1997; FAHRBACH; PFAFF, 1986; GIORDANO et al., 1989) são mediados, em parte, por efeitos sobre o sistema ocitocinérgico (PEDERSEN, 1997; BALE et al., 1995), uma vez que o estrógeno aumenta a ligação aos receptores de ocitocina. Administração intracerebroventricular de ocitocina estimula rapidamente o comportamento maternal em ratas virgens (PEDERSEN; PRANGE, 1979; PEDERSEN, et al., 1982). O efeito da ocitocina é

abolido pela quando as fêmeas são ovariectomizadas e reintegrado com o tratamento com estrogênio. A infusão de ocitocina diretamente na área pré-óptica medial (MPA) aumenta a expressão do comportamento materno (PEDERSEN et al., 1994).

No presente estudo, ratas lactantes diferem quanto à ocorrência e o tempo gasto com os comportamentos maternos ao longo dos dias após o parto (Tabela 1 e 2). De acordo com os resultados, observa-se que as ratas no 3º e 5º dias de lactação gastam um período considerável do dia (Figura 7 e 8) amamentando, sendo o tempo gasto maior durante o período claro do dia (37 % no terceiro dia e, 31,7 % no quinto dia). Esses dados corroboram pesquisas anteriores de Slamberová et al. (2001) que demonstraram em seus estudos diferenças nos cuidados maternos e não maternos durante as fases do dia, claro ou escuro, sendo a frequência da amamentação maior durante o período claro do dia quando comparado ao período escuro; e ainda, os cuidados não maternos, ou seja, aqueles direcionados a própria mãe, como comer, auto-limpeza e forragear, ocorrem com maior frequência durante o ciclo escuro.

Segundo Frances et al. (2003) que avaliaram comportamentos maternos durante os dez dias logo após o parto os comportamentos de lambar e amamentação com cifose é significativamente maior do terceiro ao oitavo dia de lactação, em relação ao nono e décimo dias.

O comportamento maternal consiste de atividades locomotoras ativas, como, busca de filhotes e lambar, seguido de posturas de amamentação. A postura de amamentação mais característica, especialmente no início da lactação (STERN; LEVINE, 1972), é a posição arqueada, recentemente chamada de “cifose” (STERN, 1996a), a qual é iniciada pela estimulação da região ventral, principalmente pela sucção (STERN; JOHNSON, 1990; STERN et al., 1992; STERN, 1996a). Lordose e cifose são caracterizadas pela simetria bilateral do apoio rígido nas patas e dorso e ventro-flexão da coluna vertebral, respectivamente.

Durante o período claro, no 3º dia de lactação, observou-se que as ratas realizam mais comportamentos de cuidados com a prole, como por exemplo, agrupamento de filhotes, construção de ninho, amamentação. Enquanto no escuro, elas continuam amamentando e, além disso, realizam mais comportamentos de atividades gerais próprios, como *self-grooming*, beber água ou ficam paradas, em descanso (Figura 7; Tabela 1).

No 5º dia de lactação, seja no período claro ou escuro, o tempo gasto de amamentação das ratas são semelhantes (Figura 8; Tabela 2). No entanto, observa-se que os

comportamentos de agrupar e lambar ocorre de maneira significativamente maior quando comparados ao 3º dia de lactação (Tabela 3). No 5º dia, os filhotes estão com atividade locomotora mais desenvolvida, o que poderia justificar o fato da mãe ter que realizar efetivamente comportamentos de busca e agrupamento. Em humanos, avaliar o papel da mãe na dinâmica de interação com os filhos é especialmente difícil. Assim, em modelos de roedores, é possível analisar as diferentes maneiras que os filhotes influenciam na dinâmica social. Geralmente, a prole oferece interações sociais complexas lideradas pelo cuidador primário, neste caso, a rata, que precisa exercer fortemente este papel, através da comunicação de sinais, demonstração de habilidades e comportamentos de abordagem (CROMWELL, 2011), como busca de filhotes e agrupamento.

As vias sensoriais que se dirigem para o interior do SN são de suma importância na expressão do comportamento maternal da rata (KIMCHI et al., 2007). Na maioria das espécies de mamíferos, o olfato é o primeiro sentido a se desenvolver durante a reprodução (LEVY et al., 2004; SAKUMA, 2008) e está relacionado aos mecanismos de escolha do parceiro, reprodução, comportamento sexual. O sistema olfatório está localizado na porção mais rostral do telencéfalo e o processamento das informações ocorre junto aos núcleos do sistema límbico (BRUNJES et al., 2005). O amplo tamanho do sistema olfatório em relação ao restante do SN de ratos atesta o valor de sua importância.

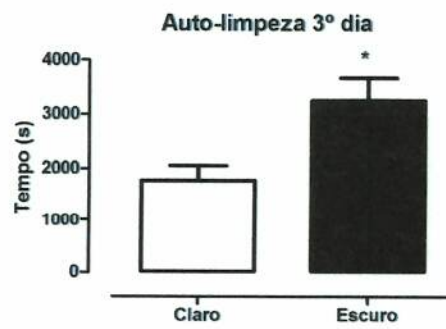
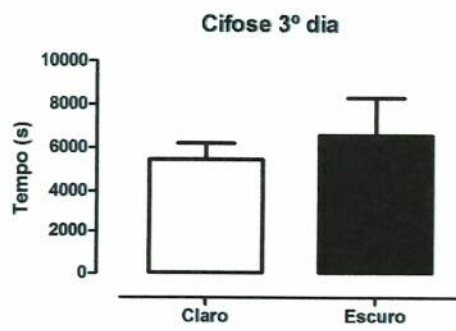
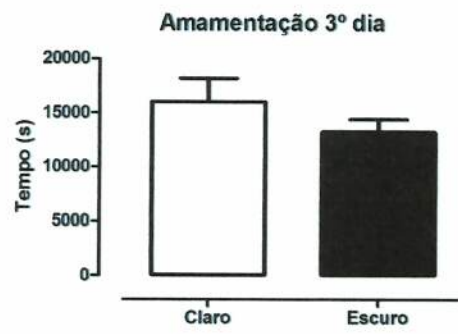
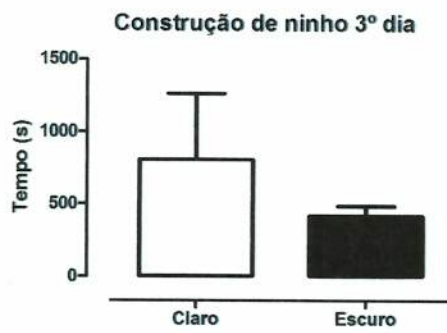
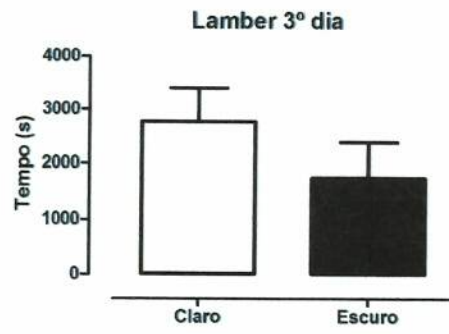
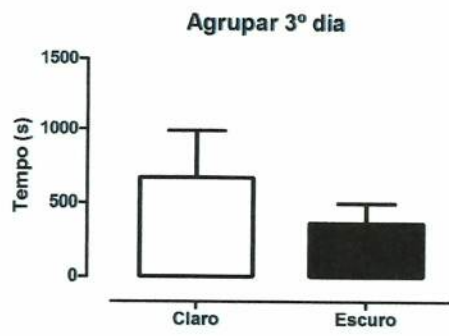
Pode-se observar de acordo com os resultados obtidos que as ratas parecem convergir para um padrão de comportamentos realizados em sequência por um determinado período de tempo, o que indicaria, por exemplo, que estímulos emitidos pelo filhote ou pelo ambiente, poderiam condicioná-las a esse padrão de comportamento. Nelson e Panksepp (1996) desenvolveram um estudo, em ratos, para avaliar a motivação social do filhote, analisando como a variação nos cuidados maternos ou alterações ambientais podem modificar a percepção dos estímulos sociais pelo filhote. Filhotes de ratos que receberam baixos níveis de lambar materno e de *grooming* tiveram o aprendizado de reconhecer a mãe através do odor prejudicado em relação a filhotes que receberam mais o comportamento de lambar e *grooming*.

Tabela 1: Média do tempo (s) dos comportamentos maternos avaliados no período claro (12 h) e escuro (12 h) de ratas no 3º dia de lactação (n = 10).

Comportamento	Tempo total claro (s)	Tempo total escuro (s)
	Média ± EP	Média ± EP
Forragear	4575 ± 526	3621 ± 505
Comer	969 ± 126	1993 ± 248*
Beber	1342 ± 201	852 ± 179
Auto-limpeza	1780 ± 273	3264 ± 406 *
Parada	7661 ± 288	9240 ± 481 *
Construção de ninho	811 ± 456	419 ± 67
Agrupar	672 ± 319	371 ± 127
Lamber	2777 ± 628	1752 ± 646
Amamentar sem cifose	16045 ± 2179	13279 ± 1160
Cifose	4467 ± 1590	6577 ± 1735

Dados apresentados em média ± EP. * = p < .05. Teste - t.

Figura 7. Tempo, em segundos, gasto no 3º dia de lactação de ratas (n = 10) com os comportamentos maternos avaliados. O dia foi dividido em período claro (12 h) e escuro (12 h). Teste t de Student * p < .05



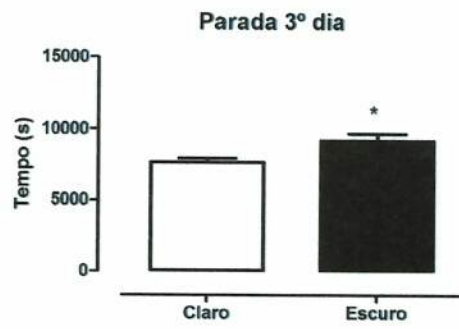
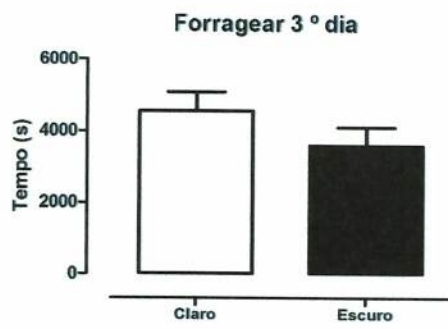
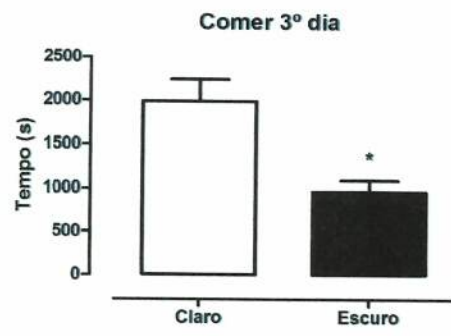
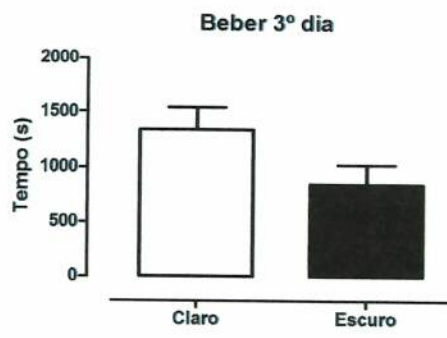
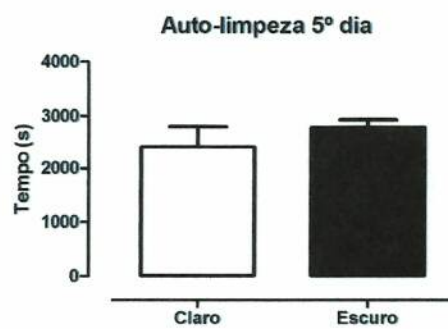
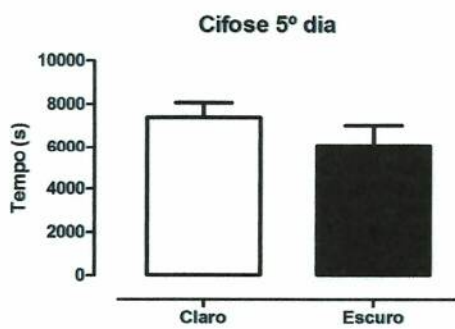
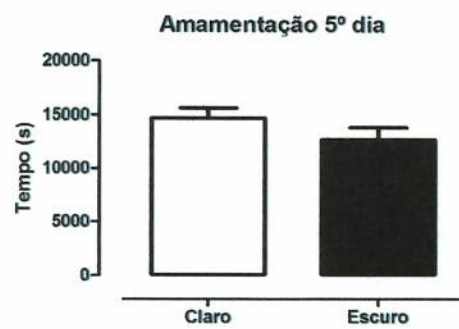
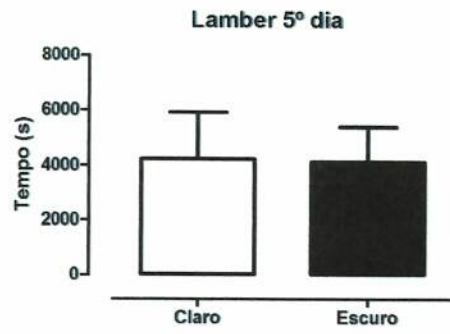


Tabela 2: Média do tempo (s) dos comportamentos maternos avaliados no período claro (12 h) e escuro (12 h) de ratas no 5º dia de lactação (n = 10).

Comportamento	Tempo total claro (s)	Tempo total escuro (s)
	Média ± EP	Média ± EP
Forragear	3687 ± 207	2539 ± 317 *
Comer	1041 ± 120	1169 ± 121
Beber	1007 ± 102	1005 ± 105
Auto-limpeza	2430 ± 375	2790 ± 141
Parada	6750 ± 601	7320 ± 1023
Construção de ninho	505 ± 160	253 ± 52
Agrupar	1329 ± 236	1315 ± 70
Lamber	4241 ± 1697	4141 ± 1266
Amamentar sem cifo	13727 ± 921	12868 ± 1121
Cifose	7408 ± 676	6109 ± 937

Dados apresentados em média ± EP. * = p < .05. Teste-t.

Figura 8. Tempo, em segundos, gasto no 5º dia de lactação de ratas (n = 10) com os comportamentos maternos avaliados. O dia foi dividido em período claro (12 h) e escuro (12 h). Teste t de Student * p < .05



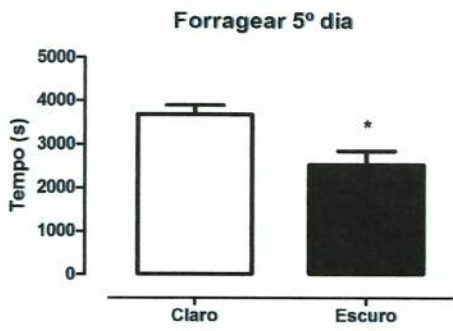
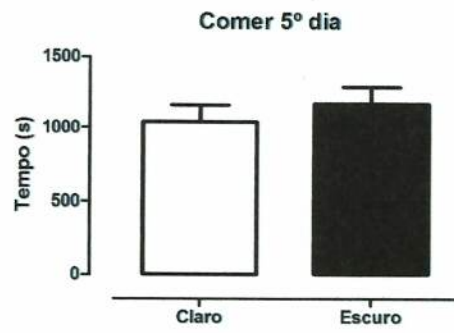
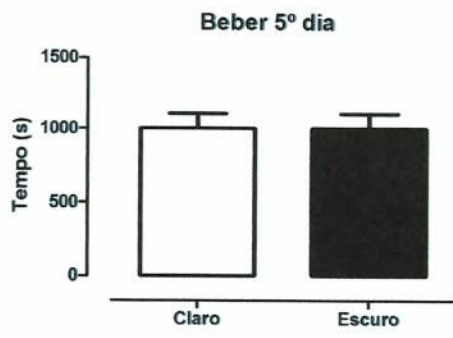


Tabela 3: Média do tempo (s) dos comportamentos expressos pela mãe avaliados no período claro (12 h) e escuro (12 h) no 3º (n = 10) e 5º (n = 10) dias de lactação.

Comportamentos/período		Forragear	Comer	Beber	Auto-limpeza	Parada
Claro	3º dia (n = 10)	4575 ± 526	1993 ± 248	1342 ± 201	1780 ± 273	7661 ± 288
	5º dia (n = 10)	3687 ± 207*	1041 ± 120*	1007 ± 102	2430 ± 375	6750 ± 601*
Escuro	3º dia (n = 10)	3621 ± 505	969 ± 126	852 ± 179	3264 ± 406	9240 ± 481
	5º dia (n = 10)	2539 ± 317*	1169 ± 121	1005 ± 105	2790 ± 141	7320 ± 1023*

Comportamentos/período		Construção de ninho	Agrupar	Lamber	Amamentar	Cifose
Claro	3º dia (n = 10)	811 ± 456	672 ± 319	2777 ± 628	16045 ± 2179	4467 ± 1590
	5º dia (n = 10)	505 ± 160	1329 ± 236	4241 ± 1697	13727 ± 921	7408 ± 676
Escuro	3º dia (n = 10)	419 ± 67	371 ± 127	1752 ± 646	13279 ± 1160	6577 ± 1735
	5º dia (n = 10)	253 ± 52	1315 ± 70*	4141 ± 1266	12868 ± 1121	6109 ± 937

Dados apresentados em média ± EP. * = p < .05. Teste-t.

Experimento 2: Análise qualitativa de neurônios c-Fos imunoreativos (IR) após ciclo de amamentação de 30 minutos

No 5º dia de lactação, os filhotes de cinco mães (n = 5) foram separados e submetidos à anóxia. Após a recuperação dos filhotes, foram devolvidos às suas mães e permaneceram durante 30 minutos em amamentação. Toda a interação mãe-filhotes foi monitorada por uma câmera de vídeo durante esse período de 30 minutos. Os parâmetros comportamentais foram avaliados durante este período para poder correlacionar a ativação das áreas encefálicas fos-IR com o comportamento materno realizado. Após 30 min., as mães foram separadas dos filhotes, anestesiadas e submetidas à perfusão transcardíaca. Seus encéfalos foram retirados e submetidos aos procedimentos de imunistoquímica anteriormente descritos.

6.2 Resultados e discussão do Experimento 2

Os parâmetros comportamentais durante um ciclo de 30 minutos de amamentação de ratas cujos filhotes sofreram ou não anóxia foi avaliado. As mães cujos filhotes sofreram insulto anóxico no 5º dia de lactação apresentaram padrões de cuidados maternos diferentes das do grupo Controle. Foi observado que as mães do grupo Anóxia realizaram mais os comportamentos de forragear, auto-limpeza e lambrar, enquanto que as mães do grupo Controle gastaram maior tempo com amamentação.

Os filhotes do grupo Anóxia foram devolvidos às suas respectivas mães ainda em processo de recuperação cardio-respiratória. Para o início do comportamento materno é necessário uma interação mãe-filhote que se inicia, afóra os mecanismos fisiológicos mediados por hormônios maternos, através da vocalização dos filhotes e de movimentos faciais e corporais (FUERTES et al., 2006). Uma vez que os filhotes encontravam-se em processo de ressuscitação, pouco exibiram vocalização, o que pode ter levado a mãe a realizar mais comportamentos voltados a si mesma, como o forragear pela caixa-moradia e auto-limpeza, comparadas às mães do grupo Controle. Entretanto, as mães do grupo Anóxia realizaram mais o comportamento de lambrar do que as do grupo Controle, o que demonstra que apesar de não compreender a nova situação a qual está sendo submetida (filhotes desmaiados na caixa-moradia), ela é uma boa mãe.

O comportamento de lambrar filhotes é importante para o desenvolvimento de áreas relacionadas ao estresse. Champagne et al. (2004) demonstraram que filhotes que recebem

poucos níveis do lamber materno apresentam, maior nível de estresse e anormalidades em sistemas neuroquímicos relacionados a comportamentos emocionais e, ainda, esses mesmos filhotes demonstraram, a longo prazo, características comportamentais de elevada ansiedade e medo.

A análise qualitativa dos neurônios Fos-I nos grupos Anóxia e Controle está representada na tabela 5 e a distribuição da imunorreatividade à proteína Fos dos núcleos marcados dos encéfalos das ratas está representada esquematicamente nas figuras de 9 a 14.

No grupo Anóxia houve alta densidade de células marcadas no córtex piriforme, na parte ventral da área septal lateral, no núcleo caudado e putame, na parte ventral globo pálido, na região paraventricular do tálamo, no núcleo ventro-medial do hipotálamo, na área pré-óptica medial do hipotálamo, e na substância cinzenta periaquedutal. Moderada densidade de células marcadas foi encontrada no tubérculo olfatório e na parte dorsal da área septal lateral, baixa densidade de marcação foi encontrada, na amígdala, no núcleo acumbens.

No grupo Controle foi encontrada alta densidade de células marcadas no córtex piriforme, no núcleo caudado e putame e na área pré-óptica medial do hipotálamo; moderada densidade de marcação foi encontrada no tubérculo olfatório, na parte ventral da área septal lateral, na parte ventral globo pálido, na região paraventricular do tálamo e na substância cinzenta periaquedutal; baixa densidade de marcação na parte dorsal da área septal lateral e no núcleo acumbens.

Numerosas áreas do cérebro respondem a estímulos coordenados por hormônios da hipófise com o objetivo de preparar a mãe para a nova fase em que ela se encontra. Sabe-se que a MPA é particularmente importante para que este estímulo inicial ocorra (NUMAN, 1994). Lesão na MPA prejudica drasticamente os comportamentos de busca e retirada de filhotes (NUMAN, 1974), bem como reduz a motivação física das mães (LEE et al., 2000). Administração de estrógeno na MPA promove resposta maternal em ratas virgens (NUMAN et al., 1977) sugerindo que o surgimento do comportamento materno no início do parto é produzido, inicialmente, por neurônios sensíveis a estrógeno presentes na MPA. No presente estudo, após o insulto anóxico os filhotes foram devolvidos as mães ainda em fase de recuperação, portanto, a elevada intensidade de marcação nessa região, demonstra intensa atividade maternal em relação a sua prole, esta, pouco responsiva, demonstrando que a motivação materna é fator predisponente.

Houve intensa marcação de células no córtex piriforme tanto nas mães do grupo anóxia quanto naquelas do grupo controle. Esta região é um dos primeiros destinos da informação olfatória em mamíferos e é crítica para a percepção dos odores (BEKKERS; SUZUKI, 2013). O córtex piriforme conecta-se através de sinapses com regiões adjacentes, como o núcleo endopiriforme, núcleo olfatório anterior, tubérculo olfatório e amígdala (NEVILLE; HABERLY, 2004; LUNDSTROM et al., 2011; HAGIWARA et al., 2012).

A ativação de células IR-fos no tubérculo olfatório tanto nas mães cujos filhotes sofreram anóxia quanto nas mães do grupo controle demonstra a importância desta região para que o início da interação mãe-filhote ocorra, a qual é essencial para que o comportamento materno seja exibido. O sistema olfatório regula o comportamento materno, entretanto existem outras vias neurais que também estão envolvidas no controle da interação mãe-filhotes através do odor. Estudos demonstram que ratas virgens expostas a filhotes não exibem comportamento maternal, demonstrando inclusive aversão ao seu odor. Quando expostas ao odor dos filhotes, logo após o parto, essas ratas exibem comportamentos maternais, um conjunto de respostas cruciais para sobrevivência dos filhotes (ROSENBLATT; MAYER, 1995). A plasticidade desse sistema ocorre em algumas espécies, como em ratas virgens, hamsters e *gerbils* (rata do deserto) que quando expostas repetidamente a odor de filhotes, exibem comportamento maternal (SIEGEL; ROSENBLATT, 1980), porém em coelhas virgens, isso não ocorre (GONZALEZ-MARISCAL, 2001). Interessante é que se o bulbo olfatório de coelhas for removido, o comportamento maternal é exibido (CHIRINO et al., 2000; GONZALEZ-MARSICAL, 2001), sugerindo que o sistema olfatório controla o comportamento materno através de conexões com outras áreas encefálicas, como o núcleo medial da amígdala, o hipotálamo e a substância cinzenta periaquedutal (NUMAN, 2006).

No presente estudo houve intensa marcação de células fos-IR na região da PAGl e PAGvl das mães do grupo Controle em relação ao grupo Anóxia. E ainda, em relação aos comportamentos maternais avaliados, as mães do grupo Controle amamentam durante um período de tempo maior (com ou sem cifo) em relação as do grupo Anóxia, entretanto, neste último, as mães realizaram mais o comportamento de lamber filhotes e auto-limpeza em relação às mães do grupo Controle. PAGl e PAGvl são de suma importância para a resposta comportamental de fêmeas de ratos durante várias fases do ciclo reprodutivo, pois atua em

sítios da integração sensório-motora para postura de lordose (LONSTEIN; STERN, 1998), exibida quando a fêmea está receptiva ao macho, e de cifose (LONSTEIN; STERN, 1997), postura onde a fêmea apresenta-se com a coluna arqueada em resposta ao estímulo de sucção (STERN, 1996; STERN et al., 1992; STERN; JOHNSON, 1990). Assim, as mães que cuidaram de filhotes anoxiados não tiveram estímulos para exibir o reflexo postural de cifose, entretanto, não prejudicou cuidados maternos voltados diretamente aos filhotes, pois o comportamento de lambar foi exibido.

A intensa marcação no VP das mães cujos filhotes sofreram anóxia e moderada marcação das mães do grupo Controle sugere a participação desta região no comportamento materno. Existem evidências que a MPA/vBST regula a resposta materna voluntária através de conexões com o sistema mesolímbico dopaminérgico (NUMAN, 2006; 2007). Numan e Stolzenberg (2009) sugerem que um circuito neural hipotético regula o comportamento materno e consiste num circuito de recompensa entre área tegmental ventral, núcleo acumbens, pálido ventral e área pré-óptica medial e o núcleo “bed” da estria terminal. Uma vez que o VP envia projeções para áreas motoras do tronco encefálico, a ativação desta região no presente estudo demonstra o envolvimento motivacional motor relacionado ao cuidado materno.

Houve baixa marcação de células em ambos os grupos estudados na região do núcleo acumbens. As interações após o parto com filhotes aumenta a liberação de dopamina no núcleo acumbens (HANSEN et al., 1993), e lesões prejudicam alguns cuidados maternos, tais como, os comportamentos de busca de filhotes e lambar (HANSEN et al., 1991; LEE et al., 2000).

Nos núcleos hipotalâmicos de ratas cujos filhotes sofreram anóxia houve intensidade de marcação moderada no periventricular e ventro-medial, e intensa no núcleo posterior, comparados ao grupo Controle. A ativação do VMH corrobora estudos anteriores que demonstram que o VMH participa do circuito neural motivacional do comportamento materno juntamente com a MPA, BST (NUMAN; INSEL, 2003; NUMAN, 2009). Sabe-se que o hipotálamo está intimamente envolvido em eventos de estresse e ansiedade (DARNAUDÉRY; MACCARI, 2008; LUPIEN et al., 2009). O estresse ao qual a mãe foi submetida quando seus filhotes foram devolvidos após insulto anóxico pode ter modificado padrões do comportamento maternal ativando essas regiões.

Tabela 4: Média do tempo (s) dos comportamentos maternos avaliados durante um ciclo de 30 min. de amamentação de ratas com filhotes Anóxia (A, n = 10) e Controle (C, n = 10).

Comportamento	C	A
	Média ± EP	Média ± EP
Forragear	85 ± 9,0	279 ± 20 *
Comer	77 ± 6,3	45 ± 3,0
Beber	96 ± 8,1	77 ± 5,6
Auto-limpeza	198 ± 17,2	272 ± 15,7 *
Parada	50 ± 3,1	67 ± 5,4
Construção de ninho	126 ± 7,8	154 ± 10,0
Agrupar	232 ± 12,3	178 ± 14,2
Lamber	120 ± 9,8	308 ± 22,0*
Amamentar sem cifose	276 ± 13,6 *	180 ± 11,2
Cifose	530 ± 35,7 *	233 ± 13,8

Dados apresentados em média ± EP. * = p < .05. Teste-t.

Tabela 5: Análise semi-quantitativa dos neurônios fos-IR de ratas dos grupos Controle (C, n = 5) e Anóxia (A, n = 5).

Regiões do encéfalo	C	A
Córtex cerebral		
Pir (córtex piriforme)	+++	+++
Tu (tubérculo olfatório)	++	++
Região septal		
LSV (parte ventral)	++	+++
LSD (parte dorsal)	+	++
Núcleos da base		
CPu (núcleo caudado e putame)	+++	+++
VP (parte ventral do pálido)	++	+++
AcbC (núcleo acumbens)	+	+
Tálamo		
PV (paraventricular)	++	+++
Hipotálamo		
Pe (zona periventricular)	+	+
VMH (núcleo ventro-medial)	++	+++
PH (posterior)	++	+++
MPA (área pré-óptica medial)	+++	++
Mesencéfalo		
PAGl (parte lateral da substância cinzenta periaquedutal)	++	+++
PAGvl (parte ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal)	+++	++

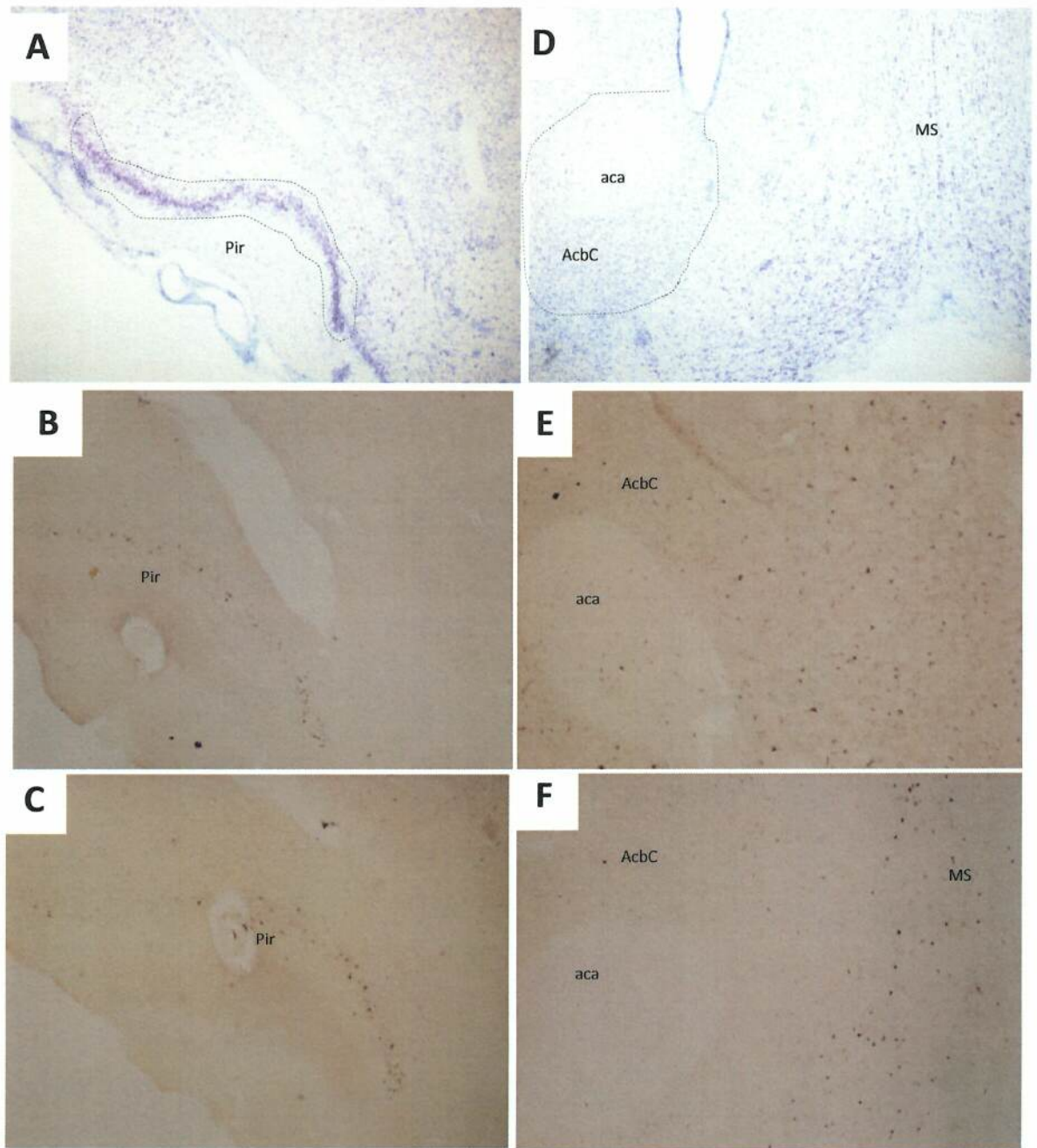


Figura 9. Fotomicrografias em campo claro (4 x) de cortes coronais (30 μm) de ratos reagidos contra proteína Fos evidenciando a região do córtex piriforme (A, B, C) e do núcleo acumbens (D, E, F). A e D: corte reagido pelo método de Nissl; B e E: grupo Anóxia; C e F: grupo Controle. Barra de escala 500 μm .

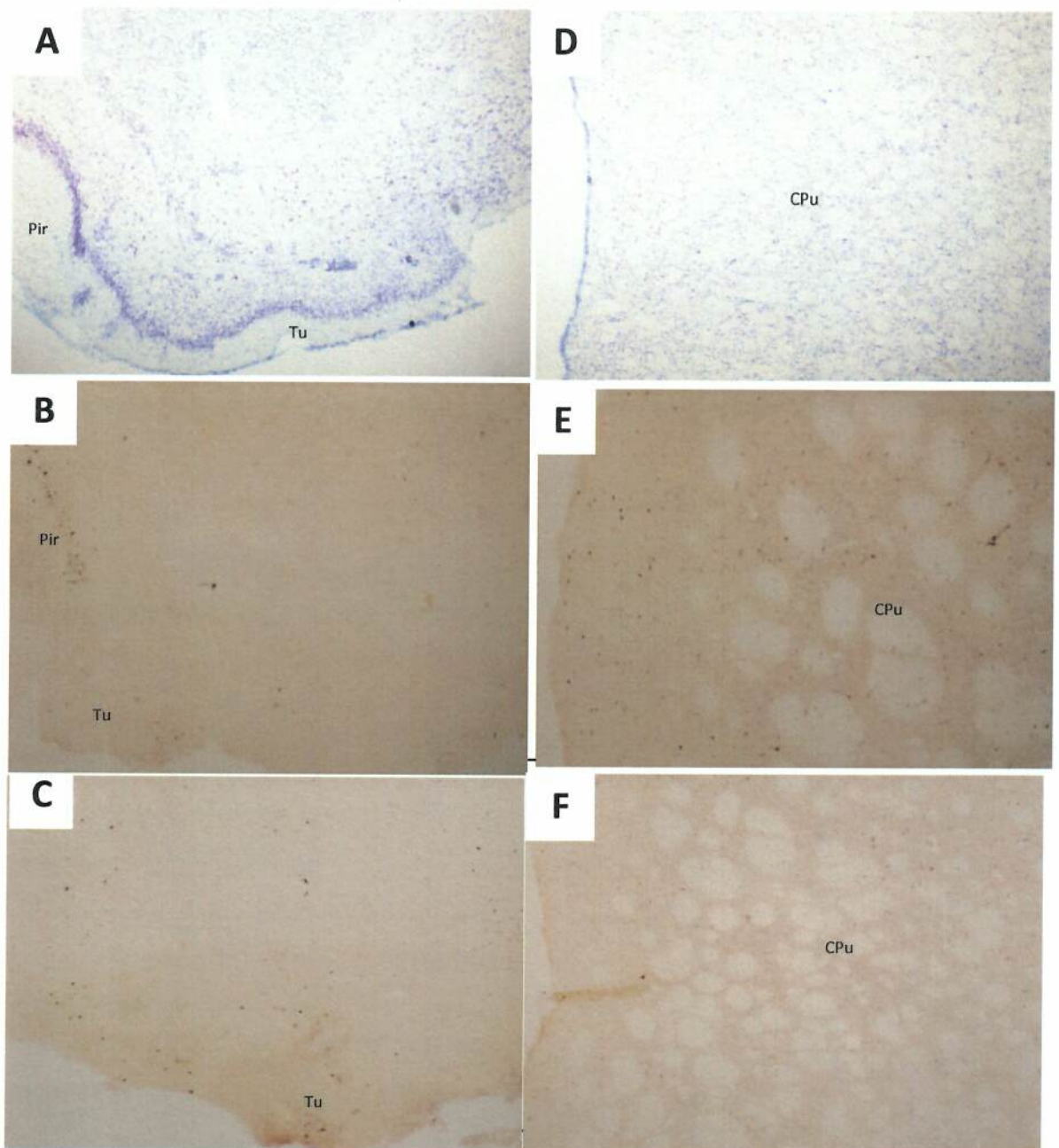


Figura 10. Fotomicrografias em campo claro (4 x) de cortes coronais (30 μ m) de ratas reagidos contra proteína Fos evidenciando a região do tubérculo olfatório (A, B, C) e do núcleo caudado e putame (D, E, F). A e D: corte reagido pelo método de Nissl; B e E: grupo Anóxia; C e F: grupo Controle. Barra de escala 500 μ m.

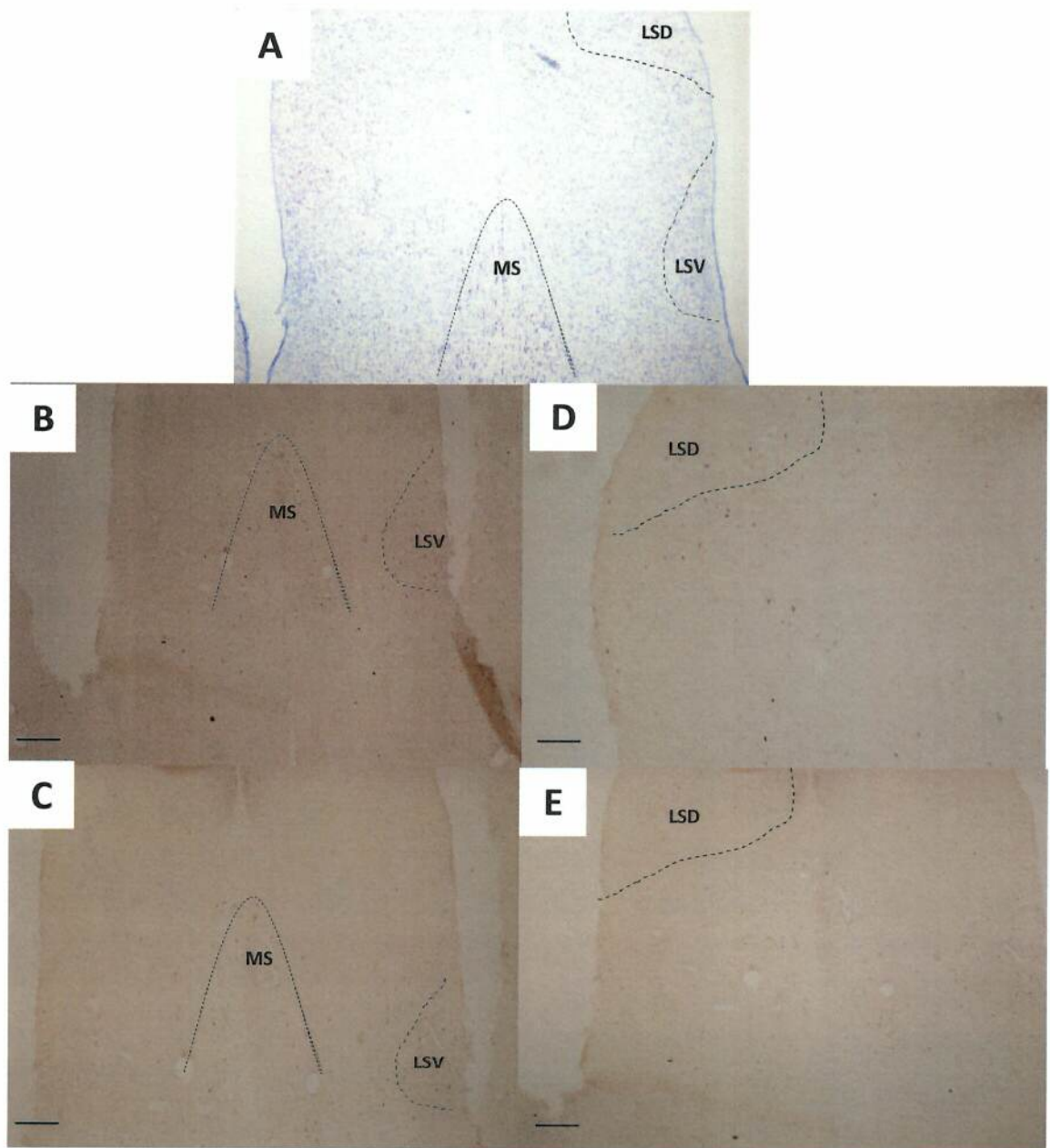


Figura 11. Fotomicrografias em campo claro (4 x) de cortes coronais (30 μm) de ratas reagidos contra proteína Fos evidenciando a área septal. MS: núcleo septal, parte medial; LSD: núcleo lateral septal, parte dorsal; LSV: núcleo lateral septal, parte ventral. A: corte reagido pelo método de Nissl; B e D: grupo Anóxia; C e E: grupo Controle. Barra de escala 500 μm .

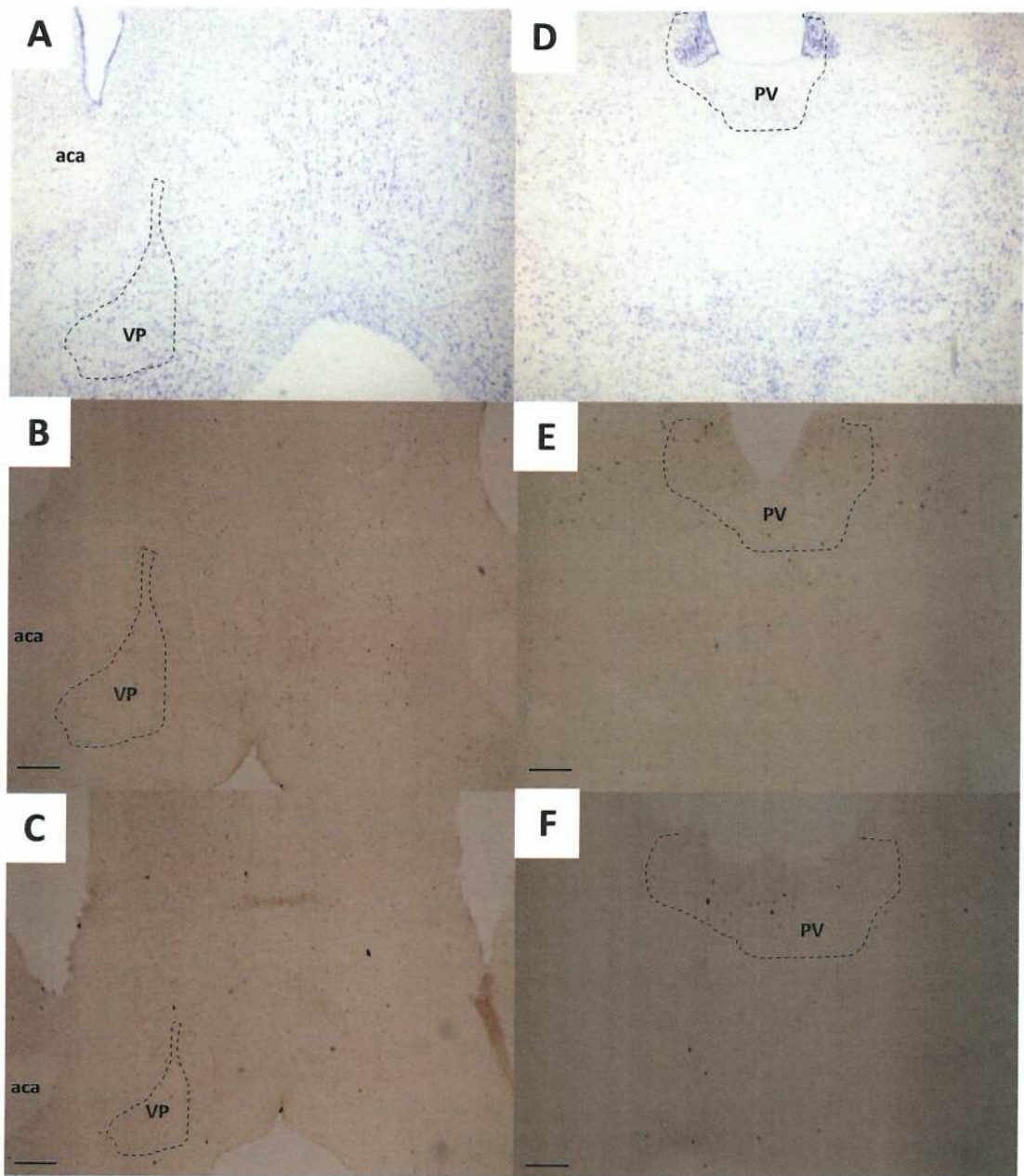


Figura 12. Fotomicrografias em campo claro (4 x) de cortes coronais (30 μm) de ratos reagidos contra proteína Fos evidenciando a região ventral do pálido (VP) (A, B, C) e região paraventricular do tálamo (D, E, F). A e D: corte reagido pelo método de Nissl; B e E: grupo Anóxia; C e F: grupo Controle. Barra de escala 500 μm .

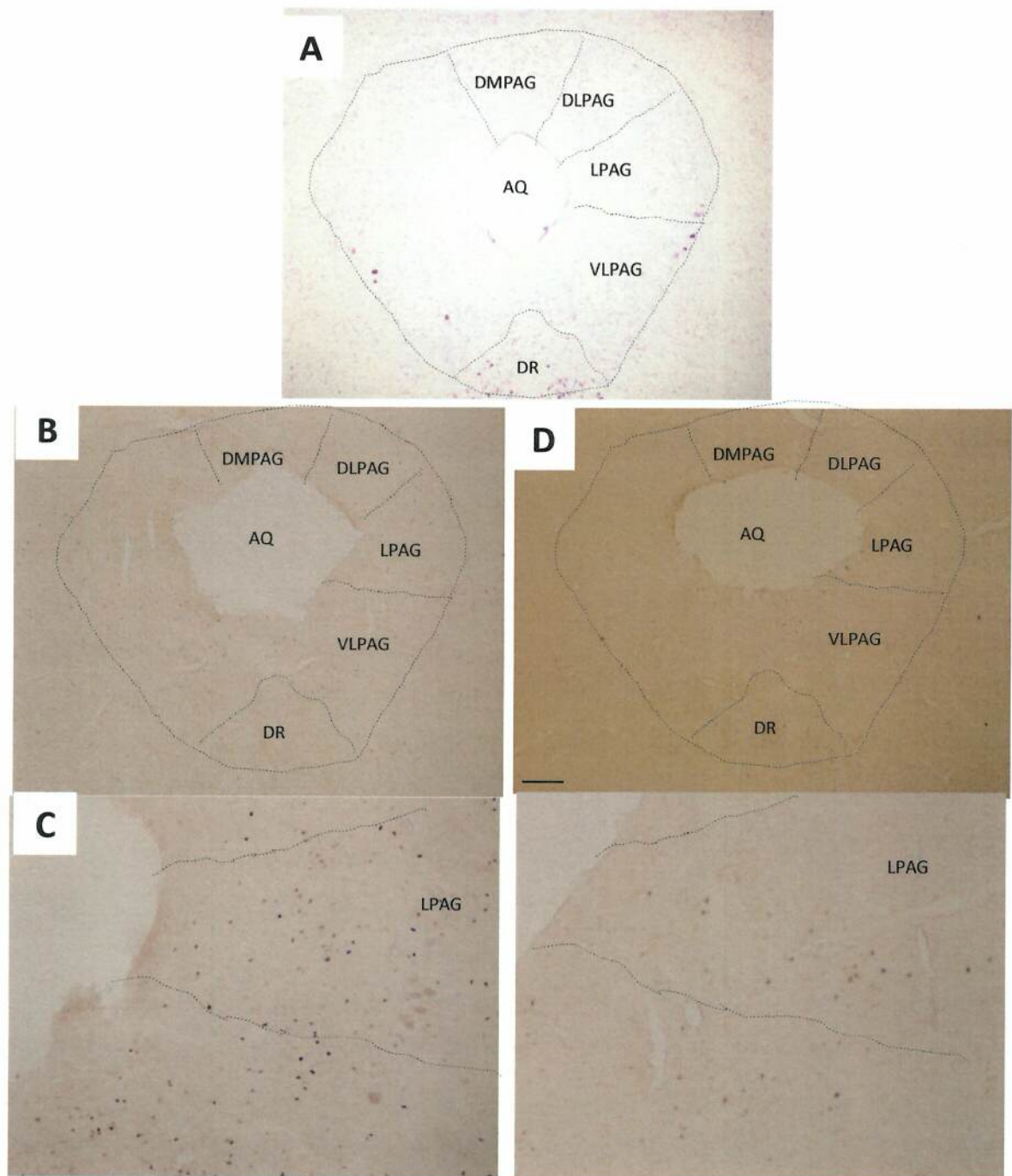


Figura 13. Fotomicrografias em campo claro de cortes coronais (30 μm) de ratas reagidos contra proteína Fos evidenciando a região a substância cinzenta periaquedutal (PAG) (A, B, C) A: corte reagido pelo método de Nissl; B e C: grupo Anóxia (4 x; 10 x, respectivamente); D e E: grupo Controle (4 x; 10 x, respectivamente). Barra de escala 500 μm .

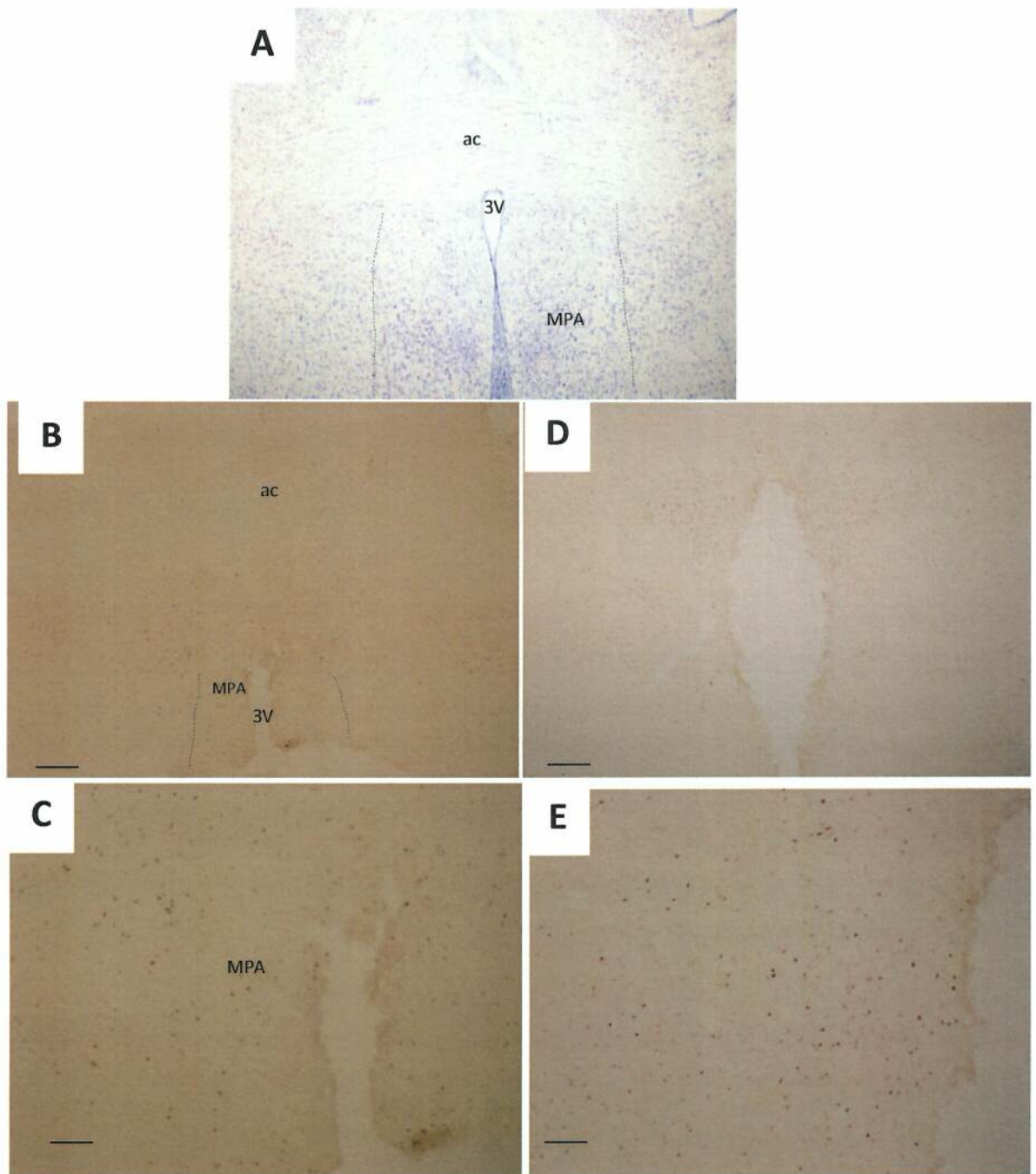


Figura 14. Fotomicrografias em campo claro de cortes coronais (30 μm) de ratas reagidos contra proteína Fos evidenciando a área pré-óptica medial (MPA). A: corte reagido pelo método de Nissl; B e E: grupo Anóxia (4 x; 10 x, respectivamente); D e E: grupo Controle (4 x; 10 x, respectivamente). Barra de escala 500 μm .

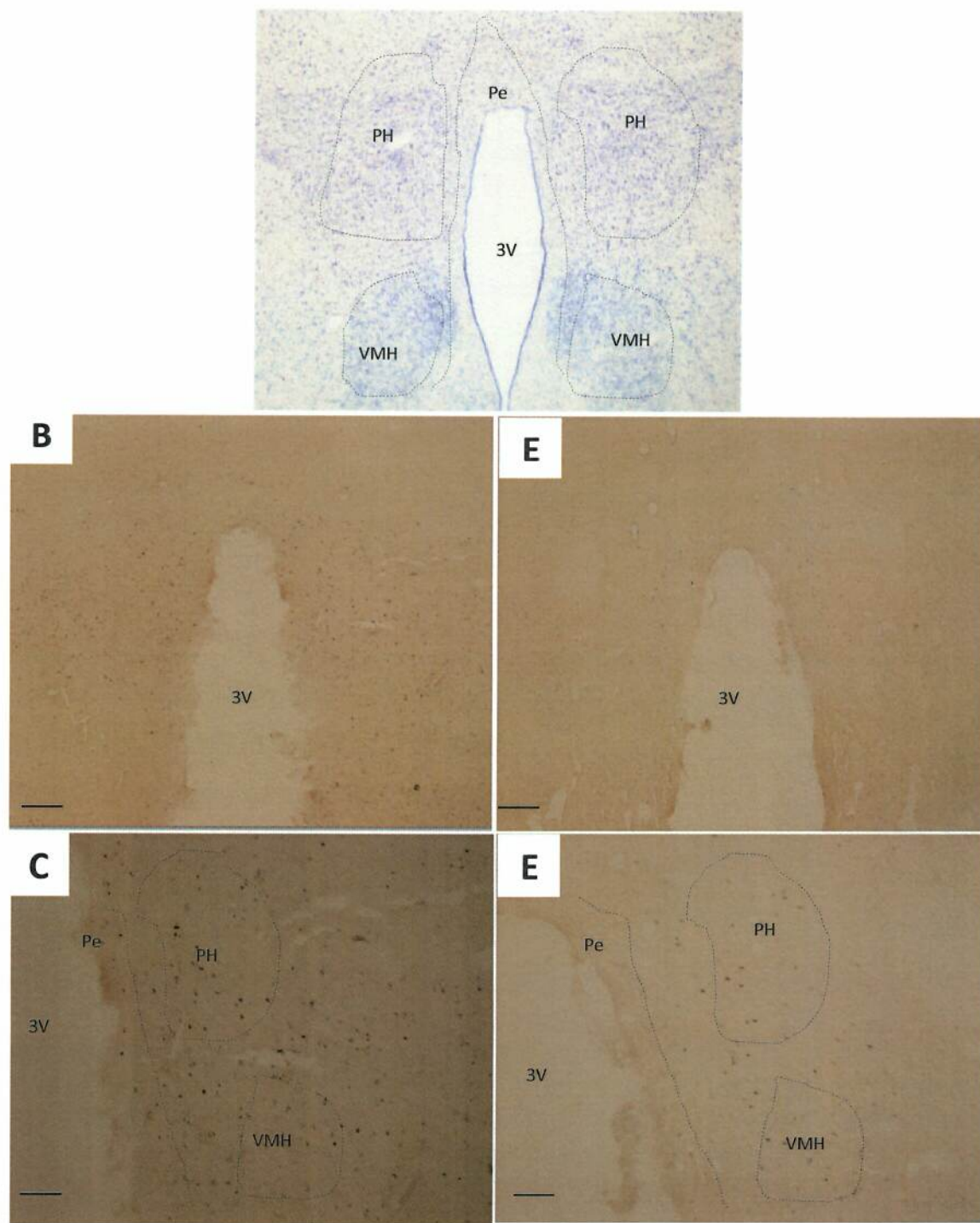


Figura 15. Fotomicrografias em campo claro de cortes coronais (30 μm) de ratas reagidos contra proteína Fos evidenciando o hipotálamo. A: corte reagido pelo método de Nissl; B e E: grupo Anóxia (4 x; 10 x, respectivamente); D e E: grupo Controle (4 x; 10 x, respectivamente). Barra de escala 500 μm .

7 CONCLUSÃO

A análise de 24 horas do comportamento maternal no 3° e 5° dias de lactação demonstrou que as ratas passam cerca de 30 % do seu tempo durante o período claro amamentando.

Durante o período claro do 3° dia as mães realizam mais cuidados voltados à prole, como agrupamento de filhotes, construção de ninho e amamentação, enquanto que no escuro além de amamentar, realizam comportamentos voltados a ela mesma, como auto-limpeza, forrageamento. No 5° dia de lactação, seja no claro ou no escuro, a mãe dedica-se de maneira semelhante a amamentação. Entretanto, os comportamentos de agrupamento e lambar filhotes são realizados com mais frequência quando comparado com o 3° dia de lactação.

O insulto anóxico no 5° dia de lactação promoveu diferença nos parâmetros de comportamento materno. Mães com filhotes do grupo Anóxia realizaram mais comportamentos de forragear, auto-limpeza e lambar, quando comparadas às mães que cuidaram de filhotes do grupo Controle, que realizaram mais o comportamento de amamentar.

A ativação das áreas encefálicas fos-IR maternas mediante insulto anóxico nos filhotes demonstrou que o córtex piriforme, o tubérculo olfatório, núcleo caudado e putame e da área pré-óptica medial das mães estão ativadas de maneira semelhante em ambos os grupos.

A região ventral da área septal lateral, a região ventral do pálido, a região paraventricular do hipotálamo e a substância cinzenta periaquedutal apresentaram elevada marcação nas mães cujos filhotes sofreram anóxia quando comparadas ao grupo Controle, que apresentou marcação moderada.

Os achados do nosso estudo, em ratos, podem contribuir para uma melhor compreensão de padrões do comportamento maternal após insulto anóxico e ativação das áreas encefálicas com parâmetro comportamental avaliado. A manipulação dos filhotes através da privação de oxigênio pode levar a efeitos diretos na interação mãe-filhotes, podendo levar a alterações comportamentais a longo prazo.

CAPÍTULO II

Efeito da anóxia sobre o desenvolvimento somático e sensório-motor dos filhotes.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar a influência da anóxia no desenvolvimento somático e na ontogênese de reflexos dos filhotes machos. Ratas Wistar foram acasaladas (2:1). Um dia após o parto 8 neonatos machos foram selecionados e mantidos com suas mães do 1º ao 21º dia pós-natal (dpn). As mães foram divididas em dois grupos: 1 - Grupo anóxia (A, n = 20), cujos filhotes sofreram insulto anóxico no 5º dia de lactação, e 2 - Grupo controle (C, n = 16). Para a anóxia, a câmara foi saturada completamente com nitrogênio 100% a um fluxo de 3L/minuto e pressão próxima à pressão atmosférica (aproximadamente 101,7 kPa). Os animais foram então colocados rapidamente na câmara, permanecendo durante 19 minutos nestas condições, tempo este considerado o tempo máximo para não ocorrer morte massiva dos neonatos. O grupo C foi apenas colocado na caixa experimental e, ao final dos 19 min., foram devolvidos as suas respectivas mães. O investigador "cego" desconhecia a que grupo pertencia cada animal avaliado quanto ao: peso corporal (PC), eixo longitudinal do corpo (EL), comprimento da cauda (CC), eixo látero-lateral do crânio (ELLC) e eixo ântero-posterior do crânio (EAPC). Também foram avaliados quanto ao aparecimento dos seguintes reflexos: recuperação do decúbito (RD), colocação pelas vibrissas (CV), aversão ao precipício (AP), geotaxia negativa (GN), resposta ao susto (RS) e aceleração (A). Foi registrado o dia de maturação das características físicas: abertura do pavilhão auricular (APA), abertura do conduto auditivo (ACA), irrupção dos incisivos superiores (IIS) e inferiores (IIS), e abertura dos olhos (AO). Houve aumento no ganho de PC e maior crescimento do EL durante o período de lactação dos filhotes que sofreram anóxia em relação ao grupo Controle. O ELLC e EAPC dos filhotes do grupo A também se apresentou maior em relação ao grupo C. Houve atraso na ontogênese da maioria dos testes reflexos dos filhotes do grupo Anóxia. Os resultados deste estudo demonstram os efeitos da anóxia sobre o crescimento somático e desenvolvimento sensório-motor de ratos durante o desenvolvimento do SN, sugerindo que a privação de oxigênio na fase de crescimento rápido do encéfalo pode ter consequências a longo prazo e isso vai depender da magnitude do insulto.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento do sistema nervoso

Durante a ontogênese do sistema nervoso (SN), Morgane et al. (1978) identificaram “períodos críticos” de vulnerabilidade a agressões. O primeiro período crítico ocorre durante a multiplicação e organização iniciais dos neuroblastos, os quais, em mamíferos acontece no período pré-natal (MORGANE et al., 1993). O segundo período corresponde, no rato, à fase de aleitamento (WINICK; NOBLE, 1966), onde há crescimento rápido do encéfalo, com migração e diferenciação neuronal, sinaptogênese, multiplicação glial e mielinização (DOBBING, 1964; MORGANE et al., 1978). Tais eventos complexos e precisos dão origem a intrincados circuitos neurais essenciais para a integração da informação sensorial e das funções cognitivas (VITALIS; PARNAVELAS, 2003). Durante o desenvolvimento precoce pós-natal, a formação das sinapses e a ocorrência de eventos regressivos, tais como, a morte programada de células e o refinamento dos axônios, permitem a maturação dos circuitos nervosos. Esses eventos são regulados por uma combinação de fatores genéticos e epigenéticos. Embora os genes sejam importantes na formação do sistema nervoso central (SNC), os fatores epigenéticos, ou seja, os neurotransmissores, neuropeptídeos e fatores de crescimento são instrumentos fundamentais para o seu desenvolvimento (VITALIS; PARNAVELAS, 2003). Assim, agressões durante essas fases podem modificar os eventos ontogenéticos sequenciais com efeitos diversos e persistentes sobre o SN (DOBBING, 1970; MORGANE et al., 1993).

No SNC de mamíferos o crescimento e diferenciação de neurônios e células da glia são eventos predominantemente pós-natais (ALTMAN, 1967). As vias migratórias neuronais desenvolvem-se em períodos diferentes do desenvolvimento, por exemplo, neurônios dopaminérgicos surgem mais precocemente e mais rapidamente que neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos (LOIZOU, 1972). Em ratos a quantidade de neurônios dopaminérgicos no primeiro dia de vida pós-natal é a mesma que na idade adulta, sendo a proliferação das vias terminais pobremente desenvolvidas neste último caso (OLSON; SEIGER 1972; VOORN et al., 1988). Fibras dopaminérgicas começam a invadir o neostriatum antes do nascimento (SEIGER; OLSON, 1973), os terminais axônicos alcançam picos de desenvolvimento por volta da quarta semana de vida pós-natal, porém um amadurecimento só é alcançado após várias semanas de vida pós-natal (ANTONOPOULOS et al., 2002). Paralelamente, existem ondas naturais de mortes neuronais pós-natais que

aumentam a susceptibilidade de sobrevivência dos neurônios em situações de perda energética (OO; BURKE, 1997; ANTONOPOULOS et al., 2002).

Os primeiros neurônios serotoninérgicos, em ratos, aparecem entre 12^o e 14^o dias da gestação (LAUDER; BLOOM, 1971). Em todas as espécies estudadas o sistema serotoninérgico atinge seu pico de atividade durante os estágios precoces do desenvolvimento diminuindo progressivamente na vida adulta, por morte neuronal (HEDNER et al., 1986; TOTH; FEKETE, 1986; WHITAKER-AZMITIA, 2001). Durante o desenvolvimento do SN a 5-HT age possivelmente como um fator neuronal trófico, atuando em seus múltiplos receptores, promovendo a auto-regulação do desenvolvimento dos neurônios serotoninérgicos e participando do desenvolvimento de tecidos-alvo (HAMON; EMERIT, 1989; WHITAKER-AZMITIA et al., 1996; LAUDER et al., 1990). Em animais adultos, os neurônios serotoninérgicos localizados nos núcleos da rafe no tronco encefálico participam de mecanismos respiratórios, termorreguladores e do controle autonômico (HODGES et al., 2008; RAMAGE; VILLALON, 2008; CORCORAN et al., 2009).

Entre os fatores externos que podem alterar o crescimento e o desenvolvimento do SN estão as alterações nutricionais, manipulações farmacológicas dos sistemas de neurotransmissores e hipóxia/anóxia perinatal. Drásticas mudanças morfofuncionais podem ocorrer em neurônios quando essas agressões ocorrem nesta etapa vulnerável (MANHAES-DE-CASTRO et al., 2001), sendo tais alterações irreversíveis ou não, dependendo da magnitude da agressão e dos fatores ambientais aos quais foram submetidos os indivíduos (LEVITSKY; BARNES, 1972).

A interrupção temporária de oxigênio implica um desafio metabólico arriscado sempre que o insulto não culmina em desfecho fatal. A mudança radical de um metabolismo aeróbio para um anaeróbio menos eficiente resultando em redução da taxa de formação de ATP (LUBEC et al., 2000), acúmulo de lactato (CHEN et al., 1997), diminuição do pH (LUBEC et al. 2000). Déficit de ATP implica em enfraquecimento da bomba de transporte de elétrons (NUMAGANI et al., 1997), acúmulo de cálcio intracelular (AKHTER et al., 2000) e, em caso prolongado, fragmentação do DNA (AKHTER et al., 2001).

Asfíxia perinatal ainda ocorre com frequência quando o parto é prolongado, apesar dos avanços nos cuidados perinatais (BERGER; GARNIER, 2000; VOLPE, 2001; LOW, 2004; VANNUCI; HAGBERG, 2004). A incidência mundial é de cerca de 2 a 6 a cada 1000

nascidos vivos (de HANN et al., 2006), alcançando taxas maiores nos países em desenvolvimento (LAWN et al., 2005). Após a asfixia, as crianças podem apresentar sequelas neurológicas a longo prazo, cuja gravidade depende da gravidade da lesão. Asfixia grave tem sido associada à paralisia cerebral, retardo mental e epilepsia, enquanto que asfixia moderada associa-se a déficit de atenção e hiperatividade em crianças e adolescentes (MAÑERU et al., 2005). Dentre outras regiões cerebrais, os núcleos da base e hipocampo são particularmente vulneráveis a insultos hipóxico/anóxico neonatais (COWAN et al., 2003; MILLER et al., 2005; BARKOVICH, 2006) e na idade adulta (CALABRESI et al., 2000; VENKATESAN; FRUCHT, 2006).

2 JUSTIFICATIVA

O presente estudo tem por objetivo avaliar a influência da privação de oxigênio através de um modelo de anóxia neonatal sobre a ontogênese de reflexos e o desenvolvimento somático de ratos neonatos. Há poucos dados na literatura a respeito do desenvolvimento sensorio-motor e crescimento somático durante fases críticas do desenvolvimento do sistema nervoso central utilizando o modelo de anóxia neonatal deste estudo em ratos e, portanto, das possíveis seqüelas comportamentais e motoras após insulto anóxico. Desta maneira, faz-se necessário compreender as conseqüências decorrentes da privação de oxigênio numa fase em que o encéfalo é vulnerável.

3 OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo geral investigar o efeito da anóxia neonatal durante o desenvolvimento rápido do sistema nervoso central de ratos sobre o crescimento somático e a ontogênese de reflexos.

Os objetivos **específicos** deste estudo foram:

- ✓ Analisar os efeitos da anóxia neonatal sobre:
 - Evolução ponderal;
 - O aparecimento de caracteres físicos, tais como: a abertura dos olhos, desdobramento do pavilhão auricular, abertura do conduto auditivo e irrupção dos incisivos inferiores e superiores;
 - O aparecimento completo de reflexos, tais como: geotaxia negativa, colocação pelas vibrissas, aversão ao precipício, recuperação de decúbito, aceleração e resposta ao susto;
 - O crescimento dos eixos do crânio látero-lateral e ântero-posterior, o eixo longitudinal do corpo e o comprimento da cauda.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos Animais

Foram utilizadas ratas nulíparas (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com aproximadamente 90 dias de idade, mantidas no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno medindo 30 x 40 x 18 cm, em salas com sistema de ventilação constante ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo de luz de 12 h, claro e escuro (07h00 – 19h00). Água e comida foram fornecidas *ad libitum* durante todos os experimentos. Todos os esforços são feitos para reduzir o sofrimento e o número de animais utilizados. Os procedimentos descritos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) (Protocolo nº 134, fls. 38 do livro 2 para uso de animais em experimentação).

4.2 Acasalamentos e Padronização da Ninhada

No final do período claro do dia, 2 ratas foram colocadas na gaiola de um macho sexualmente experiente para o acasalamento. Logo no início do período claro do dia seguinte é realizada a análise de citologia vaginal para confirmar a presença de espermatozóides no lavado vaginal, considerando este o dia 1 da prenhez. As ratas foram mantidas na mesma gaiola, sendo separadas a poucos dias do parto. As ocorrências de nascimentos foram monitoradas diariamente até às 14h00. Após este horário, os partos foram considerados como tendo ocorrido no dia seguinte.

Um dia após o nascimento da prole (o dia do nascimento foi considerado como dia zero), 8 neonatos machos foram selecionados e mantidos com suas mães para amamentação.

No 5º dia de lactação, cinco (5) ratas tiveram suas respectivas ninhadas submetidas à anóxia. Os animais foram divididos nos grupos: anóxia (Anox) e controle (C). Para experimento de anóxia foi utilizado o mesmo protocolo descrito no capítulo I.

Após a recuperação dos animais (recuperação da coloração, da respiração e da movimentação ativa), que ocorreu em média 5 minutos após a retirada da câmara, estes foram devolvidos para a mãe e então, 24 h após a anóxia foram iniciados os testes reflexos.

O grupo controle foi exposto às mesmas condições experimentais, sem, contudo haver troca do ar dentro da câmara, ou seja, permaneceram ao ar ambiente.

4.3 Análise do crescimento somático e desenvolvimento sensório-motor

Para as avaliações, conforme procedimentos abaixo descritos, o investigador “cego” desconhecia a qual grupo pertencia os filhotes.

4.3.1 Medidas de crescimento somático e maturação de características físicas

As avaliações do crescimento somático e do desenvolvimento sensório-motor foram realizadas do 6º ao 21º dias de vida dos animais, entre 12-14h. Os parâmetros indicadores de crescimento somático avaliados foram:

Eixo látero-lateral do crânio (ELLC) – Para obtenção desta medida, os filhotes foram contidos na mão do pesquisador, e este com o auxílio de um paquímetro⁹ obteve a distância entre as duas orelhas de cada animal (Figura 16A).

Eixo antero-posterior do crânio (EAPC) – Para obtenção desta medida, o filhote foi contido na mão do pesquisador e com auxílio do paquímetro foi aferida a distância entre o focinho do animal e a articulação atlantoccipital (Figura 16B).

Eixo longitudinal do corpo (EL) – Para obtenção desta medida, o pesquisador conteve o animal de encontro a uma superfície plana (mesa). Em seguida, com uma caneta de ponta porosa, faziam-se marcas na mesa, coincidentes com o focinho (P₁) e a base da cauda (P₂) do animal. Media-se então, com a ajuda de um paquímetro, a distância entre P₁ e P₂ (Figura 16C).

Peso corporal (PC) – Foi aferido diariamente em balança digital¹⁰ a fim de, entre outros objetivos, estabelecer a evolução ponderal dos grupos experimentais durante o período de aleitamento (Figura 16D).

⁹ Starret, série 125, precisão 0.05 mm

¹⁰ Marte, S-100, sensibilidade 0.01 g

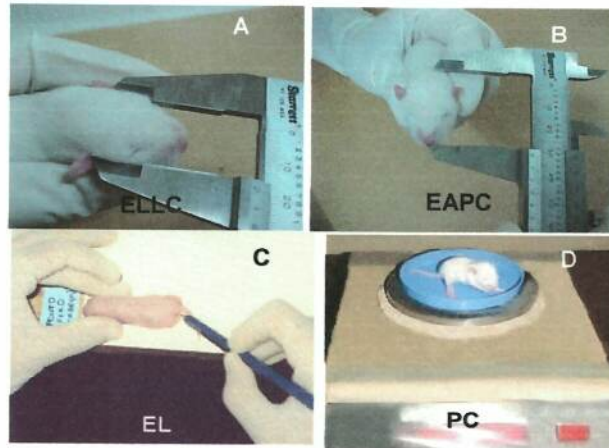


Figura 16. Fotos dos procedimentos da análise do crescimento somático: A - Eixo látero-lateral do crânio; B - Eixo antero-posterior do crânio; C - Eixo longitudinal do corpo; D - Peso corporal. (Fotografia de Antônio de Pádua Pombo de Barros).

O registro da maturação das características físicas seguiu os critérios estabelecidos por Fox (1965) e Deiró (2004, 2006). Para cada animal, foi anotado o tempo em dias desde o nascimento até a maturação da característica física avaliada. Foram realizados os seguintes procedimentos:

Desdobramento do pavilhão auricular (DPA) – Ao nascimento, o rato apresenta o pavilhão auditivo fletido sobre a abertura que irá apresentar no desenvolvimento, ou após o desenvolvimento completo, o óstio acústico externo. Assim, o DPA foi considerado no dia em que a dobra, uma vez desfeita, tornou o pavilhão livre (Figura 17A).

Abertura do conduto auditivo (ACA) - A abertura do conduto auditivo foi considerada no dia em que o óstio acústico externo pode ser visualizado (Figura 17B).

Irrupção dos incisivos superiores (IIS) e inferiores (II) - Considerou-se o rompimento da gengiva com exposição incisal, o dia da irrupção dos incisivos superiores e inferiores (Figura 17C).

Abertura dos olhos (AO) - Durante algum tempo após o nascimento, os olhos do rato permanecem fechados, totalmente encobertos pelas pálpebras. Assim, esta característica foi considerada madura no dia em que a abertura total das pálpebras permitiu a exposição normal dos olhos (Figura 17D).

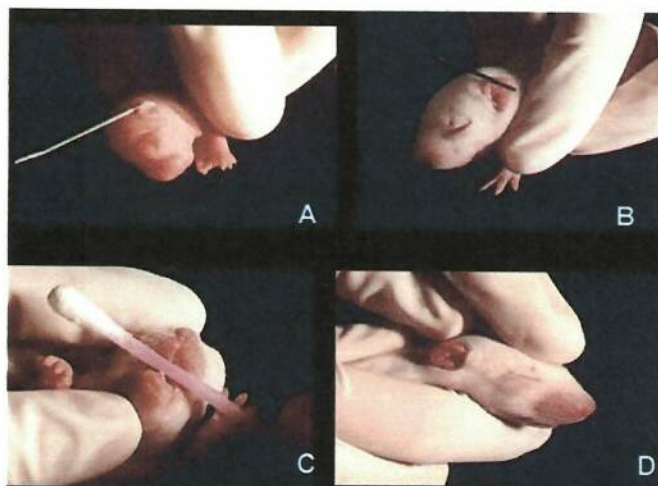


Figura 17. Fotos dos procedimentos das avaliações das características físicas: A - Desdobramento do pavilhão auricular, B - Abertura do conduto auditivo, C - Irrupção dos incisivos superiores e inferiores; D - Abertura dos olhos. (Fotografia de Antônio de Pádua Pombo de Barros).

4.3.2 Ontogênese de reflexos

A análise da maturação de reflexos foi realizada com parâmetros anteriormente descritos por Smart e Dobbing (1971) e Deiró (2004; 2006). Foi registrado o dia de consolidação dos reflexos de preensão palmar, recuperação do decúbito, colocação pelas vibrissas, aversão ao precipício, geotaxia negativa, resposta ao susto e aceleração. O dia de consolidação de cada reflexo foi considerado o primeiro após três dias consecutivos de seu aparecimento. A avaliação do desenvolvimento sensório-motor (reflexos), utilizando-se instrumentos elaborados ou existentes no laboratório, foi procedida conforme descrição abaixo:

Recuperação de decúbito (RD) - O rato foi colocado em decúbito dorsal sobre uma superfície plana. Considerou-se a resposta positiva, quando o animal girava o corpo e assumia o decúbito ventral apoiado nas quatro patas, dentro de um período máximo de 10s (Figura 18).

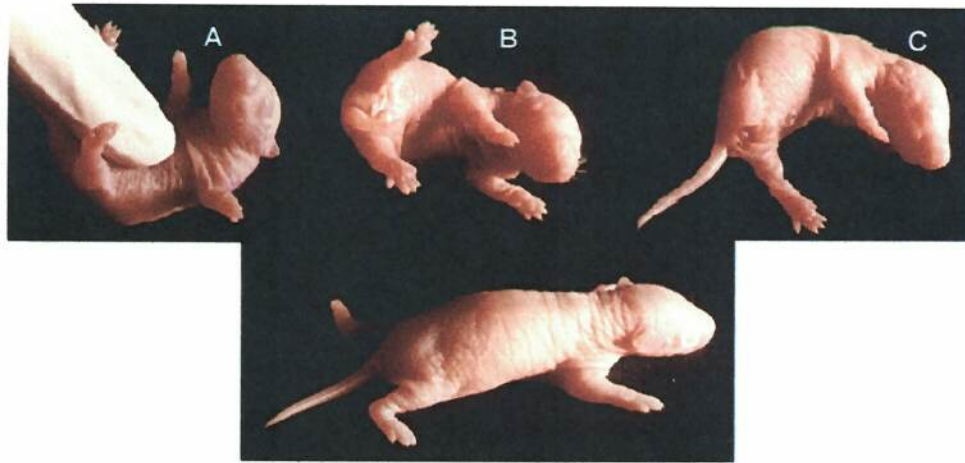


Figura 18. Fotos do reflexo de recuperação de decúbito. A - O pesquisador mantém o rato em decúbito dorsal; B e C - Retirada da contenção, o rato gira o tronco sobre o próprio eixo; D - Rato alcança o decúbito ventral apoiado sobre as quatro patas. (Fotografia de Antônio de Pádua Pombo de Barros).

Colocação pelas vibrissas (CV) - O rato foi suspenso pela cauda de tal forma que suas vibrissas tocassem levemente a borda de uma mesa. Considerou-se a resposta positiva, quando o animal, no tempo máximo de 10s, colocava as patas anteriores sobre a mesa tentando caminhar (Figura 19).

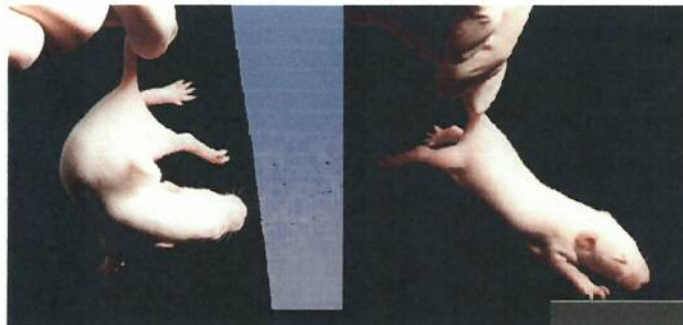


Figura 19. Fotos do reflexo de colocação pelas vibrissas. A - O pesquisador segura o rato pela cauda de modo a permitir que suas vibrissas toquem a borda de uma mesa, assim, o rato inclina seu corpo em direção à mesa; B - O rato apóia as patas anteriores e é capaz de realizar movimentos de marcha. (Fotografia de Antônio de Pádua Pombo de Barros).

Aversão ao precipício (AP) - O animal foi colocado com as patas dianteiras sobre a borda de uma superfície plana e alta (mesa) de maneira a detectar o precipício. Considerou-se a resposta positiva quando o animal, no tempo máximo de 10s, deslocava-se 45° para um dos lados caracterizando aversão ao precipício (Figura 20).

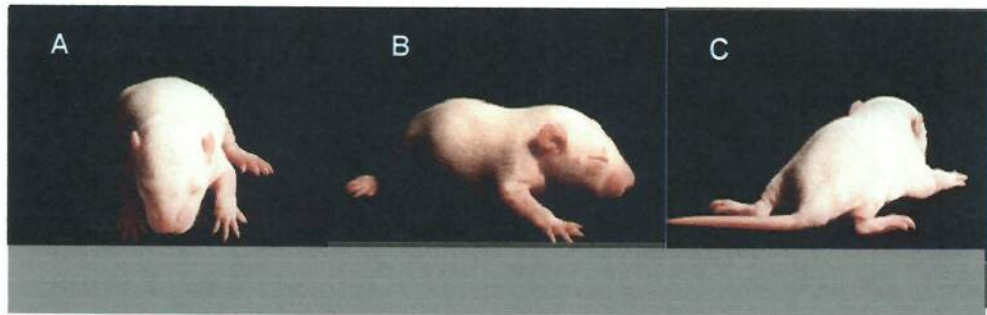


Figura 20. Fotos do reflexo de aversão ao precipício; A - O rato é colocado próximo à borda da mesa, de forma que suas patas anteriores toquem esta borda, B - O animal retrai o corpo, fazendo uma rotação lateral do tronco, C - Afasta-se da mesa. (Fotografia de Antônio de Pádua Pombo de Barros).

Geotaxia negativa (GN) - O animal foi colocado no centro de uma rampa de 45° de inclinação com a cabeça no sentido descendente. A resposta reflexa foi considerada positiva quando o animal, num período máximo de 10s, foi capaz de girar o corpo posicionando a cabeça em sentido ascendente (Figura 21).

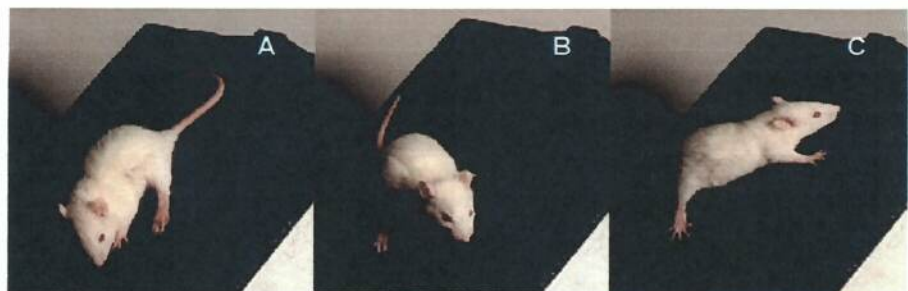


Figura 21. Fotos do reflexo de geotaxia negativa; A - O rato é colocado numa rampa inclinada (45°) com a cabeça voltada para baixo, B - Animal realizando retorno

com rotação lateral do tronco, C - Posicionamento da cabeça para a porção superior da rampa. (Fotografia de Antônio de Pádua Pombo de Barros).

Resposta ao susto (RS) - O rato foi submetido a um estampido agudo, produzido pela percussão de duas estruturas metálicas a uma distância aproximada de 10 cm do animal. A resposta foi considerada positiva, quando ocorria uma simultânea retração com imobilização rápida e involuntária do corpo do animal, característica do susto (Figura 22).



Figura 22. Estudo do reflexo de resposta ao susto. Com a batida de um bastão sobre um recipiente metálico, produz-se um ruído súbito e o animal se retrai e apresenta tremor. (Fotografia de Antônio de Pádua Pombo de Barros).

Aceleração (A) - O rato foi segurado pelas quatro patas com o dorso voltado para baixo a uma distância de 30 cm de um leito de espuma sintética (30 x 12 cm). O animal era então solto e observou-se sua queda livre. A resposta foi considerada positiva quando, durante a queda, o animal girava completamente o corpo apoiando-se sobre as quatro patas na espuma (Figura 23).



Figura 23. Estudo do reflexo de aceleração. A – O rato é solto de uma altura de 30 cm. B – Gira sobre o próprio eixo durante a queda, apoiando-se nas 4 patas ao atingir o solo. (Fotografia de Antônio de Pádua Pombo de Barros).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o teste t-Student's para as comparações do crescimento somático e aparecimento de reflexos. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão ($X \pm EP$). O nível de significância foi de $p \leq 0.05$.

6 RESULTADOS

6.2 Ontogênese de reflexos e desenvolvimento somático

O ganho de peso corporal e o crescimento do eixo longitudinal do corpo dos neonatos do grupo Anox aumentou consideravelmente, durante o período de aleitamento, do 6° ao 21° dia pós-natal (dpn), quando comparados ao grupo C (Figura 25). Houve aumento no crescimento do comprimento da cauda do grupo Anox do 11° ao 21° dpn quando comparados ao grupo C (Figura 26).

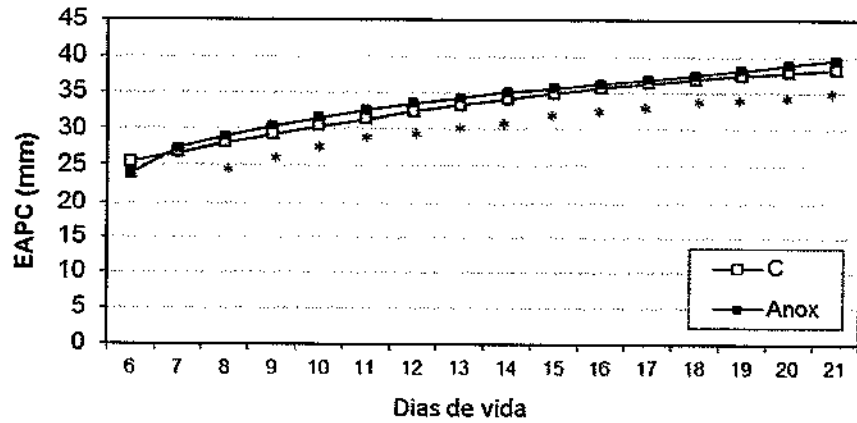
Os animais do grupo Anox apresentaram aumento no crescimento dos eixos do crânio. O EAPC apresentou-se aumentado nos filhotes do grupo Anox do 8° ao 21° dpn e, o ELLC do 6° ao 14° e 19° ao 20° dpn quando comparados aos animais do grupo C (Figura 24).

Em relação à maturação de características físicas (desdobramento do pavilhão auricular, abertura do conduto auditivo, irrupção dos incisivos superiores e inferiores, e abertura dos olhos) os animais do grupo Anox apresentaram amadurecimento antecipado da abertura do conduto auditivo e da irrupção dos incisivos inferiores em relação aos animais do grupo C (Tabela 6).

O tempo de aparecimento de cada reflexo ocorre em dias diferentes durante o período de aleitamento. Houve atraso na maturação da maioria dos testes reflexos dos animais do grupo Anox em relação aos do grupo C (Tabela 6).

A

Efeito da anóxia sobre o crescimento do eixo antero-posterior do crânio de neonatos machos



B

Efeito da anóxia sobre o crescimento do eixo látero-lateral do crânio de neonatos machos

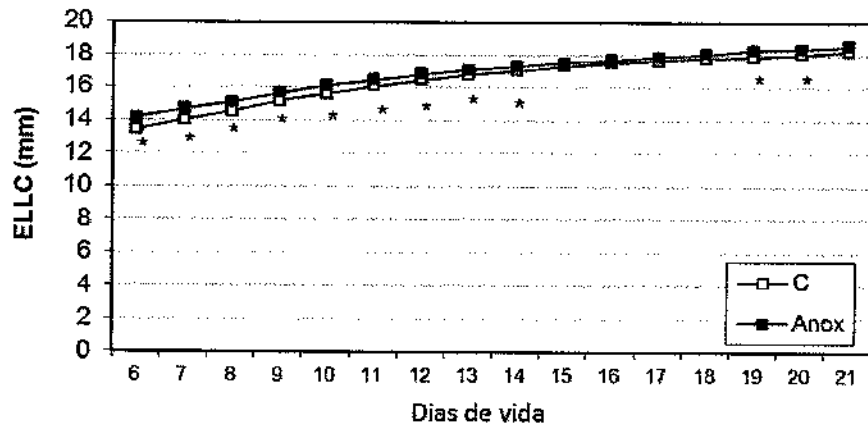
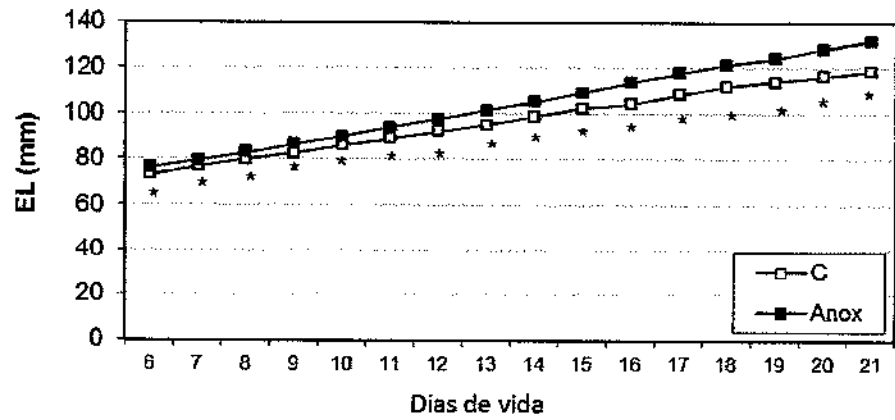


Figura 24. (A) – Eixo antero-posterior do crânio (EAPC) e (B) – Eixo látero-lateral do crânio (ELLC) do 6º ao 21º dia pós-natal, de neonatos que sofreram ou não anóxia no 5º dia de lactação. Os filhotes foram divididos em dois grupos: grupo Anox (n = 20) e grupo Controle (n = 16). Os neonatos foram avaliados durante os 21 dias pós-natal, que correspondem ao período de aleitamento. Dados apresentados em média \pm EP. * = $p < .05$, Teste t.

A

Efeito da anóxia sobre o crescimento do eixo longitudinal do corpo de neonatos machos



B

Efeito da anóxia sobre o ganho de peso corporal em neonatos machos

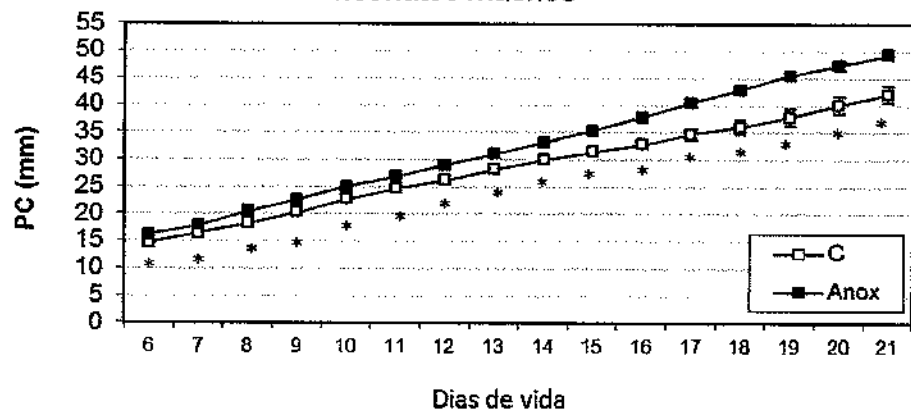


Figura 25. (A) – Eixo longitudinal do corpo (EL) e (B) – Peso corporal (PC) do 6º ao 21º dia pós-natal, de neonatos que sofreram ou não anóxia no 5º dia de lactação. Os filhotes foram divididos em dois grupos: grupo Anox (n = 20) e grupo Controle (n = 16). Os neonatos foram avaliados durante os 21 dias pós-natal, que correspondem ao período de aleitamento. Dados apresentados em média ± EP. * = $p < .05$, Teste t.

A

Efeito da anóxia sobre o comprimento da cauda em neonatos machos

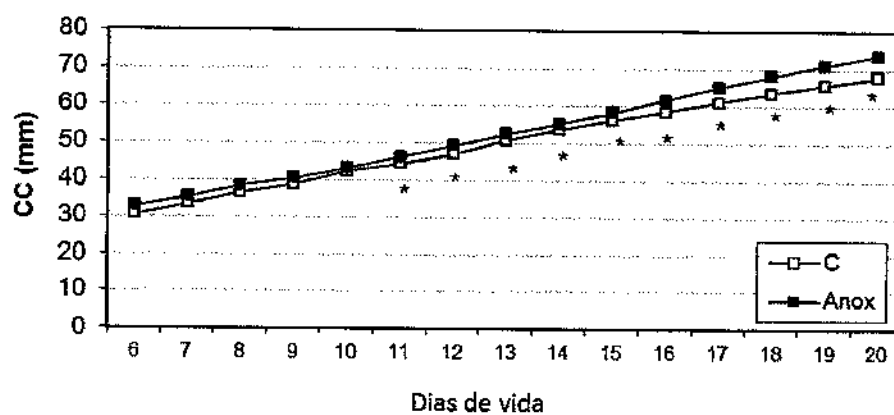


Figura 26. (A) – Comprimento da cauda (CC) do 6º ao 21º dia pós-natal, de neonatos que sofreram ou não anóxia no 5º dia de lactação. Os filhotes foram divididos em dois grupos: grupo Anox (n = 20) e grupo Controle (n = 16). Os neonatos foram avaliados durante os 21 dias pós-natal, que correspondem ao período de aleitamento. Dados apresentados em média \pm EP. * = $p < .05$, Teste t.

Tabela 6: Efeito da anóxia em neonatos machos sobre o desenvolvimento de características físicas e a maturação de reflexos.

Índices de maturação	Grupos		
	Anox	C	p
<i>(a) Características físicas</i>			
Desdobramento do pavilhão auricular	6,1 ± 0,3	2,84 ± 0,8	<.05
Abertura do conduto auditivo	11,2 ± 0,7	11,8 ± 0,7	<.05
Irrupção dos incisivos superiores	9,3 ± 0,9	8,8 ± 1,8	ns
Irrupção dos incisivos inferiores	11,3 ± 0,8	11,7 ± 0,9	ns
Abertura dos olhos	14,12 ± 0,5	14,13 ± 0,6	ns
<i>(b) Reflexos</i>			
Recuperação do decúbito	14,1 ± 0,5	7,8 ± 1,4*	<.001
Colocação pelas vibrissas	14,0 ± 0,5	12,3 ± 0,6*	<.001
Aversão ao precipício	12,7 ± 1,0	9,5 ± 2,2*	<.001
Geotaxia negativa	16,5 ± 0,9	14,7 ± 2,4*	<.001
Resposta ao susto	12,2 ± 0,9	12,2 ± 0,8	ns
Aceleração	14,1 ± 0,7	13,7 ± 2,0	ns

Dados apresentados em média e desvio padrão ($X \pm EP$). * = $p < .05$. Teste-t. ns = não-significativo.

7 DISCUSSÃO

O estudo do efeito agudo da hipóxia/anóxia em filhotes no 5º dia de lactação sobre o desenvolvimento somático e a ontogênese de reflexos da prole foi um dos objetivos deste estudo. O insulto anóxico foi eficaz em alterar o desenvolvimento somático e sensório-motor avaliados através de parâmetros de maturação de características físicas e testes reflexos dos neonatos. As alterações encontradas no presente estudo sugerem que a privação de oxigênio ocorrida desencadeou mecanismos fisiológicos que culminaram com alterações no sistema nervoso central dos neonatos que perduraram até o desmame.

No presente trabalho a hipóxia/anóxia levou a um considerável aumento no ganho de peso corporal dos filhotes e no crescimento antero-posterior do corpo dos filhotes. Embora a alteração do peso ao nascimento ocorra, principalmente, devido ao estado neuroendócrino e a mudanças nutricionais da mãe durante a gestação, os fatores que afetam o desenvolvimento pós-natal que envolve a prole é relativo a características ao nascer e aos cuidados maternos que recebe a prole (PETERS, 1988; POWER; MOORE, 1986). Estudos anteriores em condições de estresse gestacional (BAKER et al, 2008.; KINSLEY; SVARE, 1988), verificou-se que o peso dos filhotes no grupo de hipóxia são significativamente mais baixos do que nos controles. Assim, é possível que o menor peso ao nascimento encontrado em filhotes que sofreram estresse pré-natal resultou da diminuição da ingestão de alimentos pela mãe, a qual, por sua vez limitou a disponibilidade de nutrientes para os filhotes em rápido crescimento. No entanto, no presente estudo ocorreu o oposto do que temos encontrado em estudos de exposição à hipóxia gestacional. Aqui, ao realizar anóxia no 5º dia pós-natal, houve um aumento significativo do peso corporal do filhote durante o período de lactação assim como, do eixo longitudinal do corpo. Embora os mecanismos subjacentes a esses

efeitos da hipóxia/anóxia precisem ser explorados, esta descoberta sugere um sistema de adaptação através do qual o estresse hipóxico promove o crescimento do neonato.

A diferenciação dos neurônios serotoninérgicos em ratos ocorre por volta do 12^o e 14^o dias da gestação (LAUDER; BLOOM, 1971; LIDOV; MOLLIVER, 1982). O oxigênio é o substrato para diversas reações para as enzimas tirosina e triptofano-hidroxilase que participam da síntese das catecolaminas e indolaminas, respectivamente (LAUDER; BLOOM, 1971; LIDOV; MOLLIVER, 1982). Assim, a privação de oxigênio pode comprometer essas reações, levando a alterações na neurotransmissão, o que demonstra a capacidade dos tecidos em responderem a ausência de oxigênio neste período, resultando nas alterações observadas após o nascimento.

É importante considerar neste estudo o atraso no desenvolvimento das estruturas do crânio e da face. Houve um maior crescimento dos eixos látero-lateral e antero-posterior do crânio do 6^o ao 14^o e, 8^o ao 21^o dia pós-natal, respectivamente nos neonatos do grupo Anox em relação ao grupo C; Por volta do décimo dia embrionário a serotonina (5-HT) participa ativamente das interações do desenvolvimento craniofacial modulando as interações epitélio-mesenquimais, essenciais para o desenvolvimento normal desta área em ratos (SHUEY et al., 1992). Vários estudos em embriões de camundongos tratados com 5-HT sugerem um efeito protetor das células 5-HT no tecido nervoso, como na proeminência nasal, epitélio que recobre os olhos, vesícula óptica e cavidade oral (LIDOV; MOLLIVER, 1982; LAUDER; ZIMMERMAN, 1988). Estes achados indicam que esta monoamina desempenha um papel no controle das interações epitélio-mesenquimais durante a morfogênese craniofacial (SHUEY et al., 1993; HALL, 1981). Além disso, seu papel trófico na formação das estruturas craniofaciais, incluindo a maturação do germe dentário já foi descrito (MOISEIWITSCH; LAUDER, 1996).

Os reflexos aparecem em certos períodos durante o desenvolvimento ontogenético (FOX, 1965; SMART ; DOBBING, 1971). Cada reflexo apresenta o envolvimento de grupos específicos de nervos e estruturas associadas. O aparecimento ontogenético dos diferentes reflexos caracteriza a ocorrência simultânea de vários eventos durante o desenvolvimento do SNC (FOX, 1965; SMART e DOBBING, 1971). Tais eventos, como estímulos e conexões devem estar íntegros para que o sistema de neurotransmissão se organize de maneira adequada e, qualquer alteração neste padrão de organização pode alterar o desenvolvimento de reflexos evidenciando, precocemente, danos a este sistema. Durante o período pré-natal, a 5-HT exerce importante ação neurotrófica na diferenciação de diversas estruturas envolvidas na expressão dos reflexos (LAUDER, 1993; YAN et al., 1997). No presente estudo, houve atraso na maturação da maioria dos reflexos nos filhotes, o que pode indicar prejuízo motor precoce pela privação de oxigênio. Em relação ao reflexo de geotaxia negativa é importante observar a existência de três sistemas periféricos envolvidos na regulação e na correção postural: sistema vestibular, exteroceptivo e proprioceptivo (ALTMAN; SUDARSHAN, 1975). O sistema vestibular já está em atividade ao nascimento, embora as reações vestibulares sejam dificultadas devido à imaturidade do sistema motor (ALTMAN; SUDARSHAN, 1975). O reflexo de recuperação do decúbito e geotaxia negativa dos filhotes reflete desenvolvimento motor e demonstra maturação principalmente do sistema vestibular (ALTMAN; SUDARSHAN, 1975). No presente estudo, o atraso no aparecimento desses reflexos sugere retardo na maturação desses sistemas ou, mais diretamente, do sistema vestibular. Assim, a privação de oxigênio modificou a maturação de alguns reflexos, podendo sugerir que as alterações estruturais e bioquímicas tenham afetado a ontogênese do SN.

8 CONCLUSÃO

O insulto anóxico no quinto dia de lactação provoca atraso desenvolvimento sensório-motor dos filhotes e que perdura até o desmame, entretanto ocorre uma aceleração no crescimento nos parâmetros de desenvolvimento somático.

Em relação à maturação de características físicas, houve atraso no dia do desdobramento do pavilhão auricular, da abertura do conduto auditivo e da irrupção dos incisivos inferiores dos animais que sofreram anóxia em relação aos animais do grupo controle.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTER, W.; ASHRAF, Q.M.; ZANELLI, S.A.; MISHRA, O.P.; DELIVORIA-PAPADOPOULUS, M. Effect of graded hypoxia on cerebral cortical genomic DNA fragmentation in newborn piglets. **Biol Neonate**, 79: 187 – 193, 2001.
- AKHTER, W.; ZANELLI, S.A.; MISHRA, O.P.; GAVINI, G.; DELIVORIA-PAPADOPOULUS, M. Effect of graded hypoxia on neuronal nuclear calcium influx in newborn piglets. **Pediatr Res.**, 47: 22 – 66, 2000.
- ALTMAN, J. Postnatal growth and differentiation of the mammalian brain, with implications for morphological theory of memory. In: QUARTON, G.C. et al. (eds). **The neurosciences**. New York: The Rockefeller University Press, 1967.
- ALTMAN, J.; SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. **Anim. Behav.**, v. 23, p. 896-920, 1975.
- ANTONOPOULOS, J.; DORI, I.; DINOPOULOS, A.; CHIOTELLI, M.; PARNAVELAS, J.G. Postnatal development of the dopaminergic system of the striatum of the rat. **Neuroscience**, 110: 245–256, 2002.
- BAKER, S.; CHEBLI, M.; REES, S.; LEMAREC, N.; GODBOUT, R.; BIELAJEW, C. Effects of gestational stress: 1. Evaluation of maternal and juvenile offspring behavior. **Brain Res.**, 1213: 98–110, 2008.
- BALE, T.L., PEDERSEN, C.A.; DORSA, D.M. CNS oxytocin receptor mRNA expression and regulation by gonadal steroids. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 395: 269 – 280, 1995.
- BANDLER, R.; SHIPLEY, M.T. Columnar organization of the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression. **Trends Neurosci.**, 17: 379-389, 1994.
- BARKOVICH, A.J. MR imaging of the neonatal brain. **Neuroimaging Clin N Am**, 16: 117–135, 2006.
- BEKKERS, J.M.; SUZUKI, N. Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex. **Trends Neurosci.**, 2013. In press.
- BERGER, R.; GARNIER, Y. Perinatal brain injury. **J Perinat Med.**, 28: 261–285, 2000.
- BERGER-SWEENEY, J.; HOHMANN, C.F. Behavioral consequences of abnormal cortical development: Insights into developmental disabilities. **Behav. Brain Res.**, v. 86, p. 121-142, 1997.
- BESSON, J. M.; FARDIN, V.; OLIVERAS, J. L. Analgesia produced by stimulation of the periaqueductal gray matter: true antinoceptive effects versus stress effects. In: BRIDGES, R.S.; GRIMM, C.T. Reversal of morphine disruption of maternal behavior by concurrent treatment with the opiate antagonist naloxone. **Science**, 218: 166-168, 1982.
- BIAGAS, K. Hypoxic – ischemic brain injury: advancements in the understanding of mechanisms and potential avenues for therapy. **Curr. Opin. Pediatric** 11: 223– 228, 1999.

- BREDY, T.W.; GRANT, R.J.; CHAMPAGNE, D.L.; MEANEY, M.J. Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. **Eur. J. Neurosci.**, 18: 2903–2909, 2003.
- BRIDGES, R. Biochemical Basis of Parental Behavior in the Rat. **San Diego: Academic Press**, 25: 215–242, 1996.
- BRUNJES, P.C., ILLIG, K.R.; MEYER, E.A. A field guide to the anterior olfactory nucleus (cortex). **Brain Res Brain Res Rev.**, 50: 305 – 335, 2005.
- BUZNIKOV, G.A.; SHMUKLER, Y.B.; LAUDER, J.M. From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 16, p. 533–559, 1996.
- CALABRESI, P.; CENTONZE, D.; BERNARDI, G. Cellular factors controlling neuronal vulnerability in the brain: a lesson from the striatum. **Neurology**, 55: 1249 –1255, 2000.
- CALAMANDREI, G.; VENEROSI, A.P.; VALANZANO, A.; DEBERARDIS, M.A.; GRECO, A.; PUOPOLO, M.; MINGHETTI, L. Increased brain levels of F2-isoprostane are an early marker of behavioral sequels in a rat model of global perinatal asphyxia. **Pediatr. Res.**, 55: 85–92, 2004.
- CHEN Y, OGREN SO, BJELKE B, BOLME P, ENEROTH P, GROSS J, LOIDL F, HERRERA-MARSCHITZ M, ANDERSSON K. Nicotine treatment counteracts perinatal asphyxia-induced changes in the mesostriatal/limbic dopamine systems and in motor behaviour in the four-week-old male rat. **Neuroscience.**, 68 (2): 531-538, 1995.
- CHEN, Y.; ENGIDAWORK, E.; LOIDL, F.; DELL'ANNA, E.; GOINY, M.; LUBEC, G.; ANDERSSON, K.; HERRERA-MARSCHITZ, M. Short- and long-term effects of perinatal asphyxia on monoamine, amino acid and glycolysis product levels measured in the basal ganglia of the rat. **Brain Res Dev Brain Res.**, 19: 104 (1-2): 19-30, 1997.
- CHIRINO, R.; BEYER, C.; ROSENBLATT, J.S.; GONZALEZ-MARISCAL, G. Virgin female rabbits show pup-induced maternal behavior MB only after lesioning the accessory olfactory bulbs. **Developmental Psychobiology**, 36: 248, 2000.
- 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. **Behav Brain Res.**, Jan 6; 138 (1): 17-28, 2003.
- CORCORAN, A.E.; HODGES, M.R.; WU, Y.; WANG, W.; WYLIE, C.J.; DENNERIS, E.S.; RICHERSON, G.B. Medullary serotonin neurons and central CO2 chemoreception. **Respir Physiol Neurobiol.**, 168: 49 – 58, 2009.
- COWAN, F.; RUTHERFORD, M.; GROENENDAAL, F.; EKEN, P.; MERCURI, E.; BYDDER, G.M.; MEINERS, L.C.; DUBOWITZ, L.M.S.; DE VRIES, L.S. Origin and timing of brain lesions in term infants with neonatal encephalopathy. **Lancet**, 361: 736 – 742, 2003.
- CROMWELL, H.C. Rat pup social motivation: a critical component of early psychological development. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 35: 1284-1290, 2011.
- DARNAUDÉRY, M.; MACCARI, S. Epigenetic programming of the stress response in

- male and female rats by prenatal restraint stress. **Brain Res. Rev.** 57: 571–585, 2008.
- DE HANN, M.; WYATT, J.S.; ROTH, S.; VARGHA-KHADEM, F.; GADIAN, D.; MISHKI, M. Brain and cognitive-behavioural development after asphyxia at term birth. **Dev Sci.**, 9: 350 – 358, 2006.
- DELL'ANNA E, CHEN Y, ENGIDAWORK E, ANDERSSON K, LUBEC G, LUTHMAN J, HERRERA-MARSCHITZ M. Delayed neuronal death following perinatal asphyxia in rat. **Exp Brain Res.**, Jun;115 (1): 105-15, 1997.
- DEPAULIS, A.; BANDLER, R. The midbrain periaqueductal gray matter: Functional, Anatomical, and Neurochemical Organization. New York: Plenum Press, 121-138, 1991.
- DOBBING, J. The influence of early nutrition on the developing and myelination of the brain. **Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.**, v. 159, p. 503-509, 1964.
- DOBBING, J. Undernutrition and the developing brain. The relevance of animal models to the human problem. **Am. J. Dis. Child.**, v. 120, p. 411-415, 1970.
- EL-KHODOR BF, BOKSA P. Birth insult increases amphetamine-induced behavioral responses in the adult rat. **Neuroscience.**, 87 (4): 893-904, 1998.
- EL-KHODOR, B.F.; BOKSA, P. Long-term reciprocal changes in dopamine levels in prefrontal cortex versus nucleus accumbens in rats born by Caesarean section compared to vaginal birth. **Exp. Neurol.**, 145: 118–129, 1997.
- FAHRBACH, S. E.; PFAFF, D.W. Effect of preoptic region implants of dilute estradiol on the maternal behavior of ovariectomized, nulliparous rats. **Horm. Behav.**, 20: 354 – 363, 1986.
- FELICIO, L.F.; MANN, P.E.; BRIDGES, R.S. Intracerebroventricular cholecystokinin infusions block beta-endorphine-induced disruption of maternal behavior. **Pharmacol Biochem Behav**, 39: 201-204, 1991.
- FLEMING, A.S. Psychobiology of rat maternal behavior: how and where hormones act to promote maternal behavior at parturition. **Ann. NY Acad. Sci.**, 474: 234–251, 1986.
- FLEMING, A.S.; CORTER, C. Factors influencing maternal responsiveness in humans: usefulness of an animal model. **Psychoneuroendocrinology**, 13: 189 – 212, 1988.
- FLEMING, A.S.; KRAEMER, G.W.; GONZALEZ, A.; LOVIC, V.; REES, S.; MELO, A. Mothering begets mothering: the transmission of behavior and its neurobiology across generations. **Pharmacol. Biochem. Behav**, 73: 61–75, 2002.
- FLEMING, A.S.; VACCARINO, F.; LUEBKE, C. Amygdaloid inhibition of maternal behavior in the nulliparous female rat. **Physiology and Behavior**, 25, 731-743, 1980.
- FOX, M.W. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. **Anim. Behav.**, v. 13, p. 234-241, 1965.

- FRANCIS, D., et al. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science*, 286: 1155–1158, 1999.
- FUERTES, M.; SANTOS, P.L.; BEEGHLY, M.; TRONICK, E. More than maternal sensitivity shapes attachment: infant coping and temperament. *Ann N Y Acad Sci.*, 1094: 292–296, 2006.
- GIORDANO, A. L.; SIEGEL, H. I.; ROSENBLATT, J. S. Nuclear estrogen receptor binding in the preoptic area and hypothalamus of pregnancy-terminated rats: correlation with the onset of maternal behavior. *Neuroendocrinol.*, 50: 248–258, 1989.
- GONZALES-MARISCAL, G. Neuroendocrinology of maternal behavior in the rabbit.
- HAGIWARA, A.; PAL, S.K.; SATO, T.F.; WIENISCH, M.; MURTHY, V.N. Optophysiological analysis of associational circuits in the olfactory cortex. *Front. Neural Circuits*, 6: 1–17, 2012.
- HALL, B.K. The induction of neural crest derived cartilage and bone by embryonic epithelia. An analysis of the mode of action of an epithelial-mesenchymal interaction. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, v. 64, p. 30–310, 1981.
- HAMMER, R.P.; BRIDGES, R.S. Preoptic area opioids and opiate receptors increase during pregnancy and decrease during lactation, *Brain Research*, 420: 48–56, 1987.
- HAMON, M.; EMERIT, M.B. Les facteurs chimiques impliqués dans la différenciation neuronale. In: RELIER, J.P.; LAUNGER, J.; SALLE, B.L. (Ed.). *Médecine Périnatale (foetus et nouveau-né)*. Paris: Médecine-Sciences. Flammarion, 1989. p. 194–200.
- HANSEN, S.; BERGVALL, A.H.; NYIREDI, S. Interaction with pups enhances dopamine release in the ventral striatum of maternal rats: a microdialysis study, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45: 673–676, 1993.
- HANSEN, S.; HARTON, C.; WALLIN, E.; LOFBERG, L.; SVENSSON, K. The effects of 6-OHDA-induced dopamine depletions in the ventral or dorsal striatum on maternal and sexual behavior in the female rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 39: 71–77, 1991.
- HEDNER, J.; LUNDELL, K.H.; BREESE, G.R.; MUELLER, R.A.; HEDNER, T. Developmental variations in CFS monoamine metabolites during childhood. *Biol. Neonat.*, v. 49, p. 190–197, 1986.
- HODGES, M.R.; TATTERSALL, G.J.; HARRIS, M.B.; MCEVOY, S.D.; RICHERSON, D.N.; DENERIS, E.S.; JOHNSON, R.L.; CHEN, Z.F.; RICHERSON, G.B. Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. *J Neuroscience*, 28: 2495–2505, 2008.
- HRDY, S.B. *Mother nature: maternal instincts and how they shape the human species*. New York: Ballentine Publishing Group, 1999.
- JACQUIN, M.F.; ZIEGLER H.P. Trigeminal orosensation and ingestive behavior in the rat. *Behav Neurosci.* 97: 62–97, 1983.

- JANS, J.E.; LEON, M. Determinants of mother–young contact in Norway rats. **Physiol. Behav.**, 30: 919–935, 1983.
- JÜRGENS U. The role of the periaqueductal grey in vocal behavior. **Behav Brain Res.**, 62: 107-117, 1994.
- KEAY, K.A.; BUNDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neurosci Biobehav Rev.**, 25: 669-678, 2001.
- KEER SE, STERN JM. Dopamine receptor blockade in the nucleus accumbens inhibits maternal retrieval and licking, but enhances nursing behavior in lactating rats. **Physiol Behav.**, 67: 659 – 669, 1999.
- KIMCHII, T., XU, J.; DULAC, C. A functional circuit underlying male sexual behavior in the female mouse brain **Nature**, 448: 1009-1014, 2007.
- KINSLEY, C. H.; MADONIA, L.; GIFFORD, G. W.; TURESKI, K.; GRIFFIN, G. R.; LOWRY, C.; WILLIAMS, J.; COLLINS, J.; MCLEARIE, H.; LAMBERT, K. G. Motherhood improves learning and memory. **Nature**, 402 (6758): 137-138, 1999.
- KINSLEY, C.; SVARE, B. Prenatal stress alters maternal aggression in mice. **Physiol. Behav.** 42: 7–13, 1988.
- KINSLEY, C.H.; AMORY-MEYER, E. Why the maternal brain? **Journal of Neuroendocrinology**, 2011.
- KOHLHAUSER C, MOSGÖLLER W, HÖGER H, LUBEC B. Myelination deficits in brain of rats following perinatal asphyxia. **Life Sci.**, 29 (19): 2355-68, 2000.
- KUHN, C.M.; SCHANBERG, S.M. Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. **Int J Dev Neurosci.**, v. 16 (3-4): 261-70, 1998.
- LAUDER, J.M. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as developmental signal. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 600, p. 297–314, 1990.
- LAUDER, J.M.; BLOOM, F.E. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rats 1, cell differentiation. **J. Comp. Neurol.**, v. 155, p. 469-481, 1971.
- LAUDER, J.M.; WALLACE, J.A.; KREBS, H. Roles for serotonin in neuroembryogenesis. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 133, p. 477–506, 1981.
- LAUDER, J.M.; ZIMMERMAN, E.F. Sites of serotonin uptake in epithelia of the developing mouse palate, oral cavity and face: possible role in morphogenesis. **J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.**, v. 8, p. 265–276, 1988.
- LAUDER, J.M.; ZIMMERMAN, E.F. Sites of serotonin uptake in epithelia of the developing mouse palate, oral cavity and face: possible role in morphogenesis. **J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.**, v. 8, p. 265–276, 1988.

LAWN, J.E.; COUSENS, S.; ZUPAN, J. 4 million neonatal deaths: when? where? why? **Lancet**, 365: 891 – 900, 2005.

LEDOUX, J. The emotional brain. New York: Simon and Shuster, 1996.

LEE, A.; CLANCY, S; FLEMING, A.S.; Mother rats bar-press for pups: effects of lesions of the mpoa and limbic sites on maternal behavior behavior and operant responding for pup-reinforcement. **Behav. Brain Res.**, 108: 215-231, 2000.

LEVITSKY, D.A.; BARNES, R.H. Nutritional and environmental interactions in the behavioral development of the rat. Long-term effects. **Science**, v. 176, p. 68-72, 1972.

LEVY, F., KELLER, M.; POINDRON, P. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. **Hormones and Behavior**, 46: 284-302, 2004.

LIDOV, H.G.W.; MOLLIVER, M.E. Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. **Brain Res. Bull.**, v. 9, p. 559-604, 1982.

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.**, 35 (4): 264-275, 1999.

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

LONSTEIN, J. S.; STERN, J. M. Site and behavioral specificity of periaqueductal gray lesions on postpartum sexual, maternal, and aggressive behaviors in rats. **Brain Res.**, 804 (1): 21-35, 1998.

LONSTEIN, J.S.; DOMINGUEZ, J.M.; PUTNAM, S.K.; DE VRIES, G.J.; HULL, E.M. Intracellular preoptic and striatal monoamines in pregnant and lactating rats: possible role in maternal behavior. **Brain Res.**, 970: 149-58, 2003.

LOVICK, T.A. Interactions between descending pathways from the dorsal and ventrolateral periaqueductal gray matter in the rat. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. editors. **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical, and Neurochemical Organization**. New York: Plenum Press, 1991.

LOW, J.A. Determining the contribution of asphyxia to brain damage in the neonate. **J Obstet Gynaecol Res.**, 30: 276–286, 2004.

LUBEC, B.; CHIAPPE-GUTIERREZ, M.; HOEGER, H.; KITZMUELLER, E.; LUBEC, G. Glucose transporters, hexokinases and phosphofructokinase in brain of rats with perinatal asphyxia. **Pediatr. Res.**, 47: 84 – 88, 2000.

LUNDSTROM, J.N., BOESVELDT, S.; ALBRECHT, J. Central processing of the chemical senses: an overview. **ACS Chem. Neurosci.**, 2: 5 – 16, 2011.

LUPIEN, S.J.; MCEWEN, B.S.; GUNNAR, M.R.; HEIM, C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nat. Rev. Neurosci.** 10: 434–445, 2009.

MANERU, C.; SERRA-GRABULOSA, J.M.; JUNQUE, C.; SALGADO-PINEDA, P.; BARGALLO, N.; OLONDO, M.; BOTET-MARTIN, S.S.; PEREZ-POLO, J.R.; NOPPENS, K.M.; GRAFE, M.R. Biphasic changes in the levels of poly (ADPribose) polymerase-1 and caspase 3 in the immature brain following hypoxia-ischemia. **Int J Dev Neuroscience**, 23: 673 – 686, 2005.

MANHAES-DE-CASTRO, R.; BARRETO-MEDEIROS, J.M. ; MENDES-DA-SILVA, C. ; FERREIRA, L.M.P. ; GUEDES, R.C.A. ; CABRAL-FILHO, J.E. Reduction intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 121–124, 2001.

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

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

MENARD, J.L.; CHAMPAGNE, D.L.; MEANEY, M.J. Variations of maternal care differentially influence 'fear' reactivity and regional patterns of cFos immunoreactivity in response to the shock-probe burying test. **Neuroscience**, 129: 297–308, 2004.

MICELI, M.O.; FLEMING, A.S.; MALSBUY, C.W. Disruption of maternal behavior in virgin and postparturient rats following sagittal plane knife cuts in the preoptic area-hypothalamus. **Behavioral Brain Research**, 9: 337-360, 1983.

MILLER, S.P.; RAMASWAMY, V.; MICHELSON, D.; BARKOVICH, J.; HOLSHOUSER, B.; WYCLIFF, N.; GLIDDEN, D.V.; DEMING, D.; PARTRIDGE, J.C.; WU, Y.W.; ASHWAL, S.; FERREIRO, D.M. Patterns of brain injury in term neonatal encephalopathy. **J Pediatr.**, 146: 453–460, 2005.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; CANTERAS, N.S.; SUKUKARA, M.H.; NASELLO, A.G.; MACKOWIAK, I.I.; FELICIO, L.G. Periaqueductal grey cholecystinin infusions block morphine-induced disruption of maternal behavior. **Peptides**, 28 (3): 657-662, 2007.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; NASELLO, A. G.; YIN, A. J.; FELICIO, L. F. Morphine pretreatment increases opioid inhibitory effects on maternal behavior. **Brain Res Bull.**, 55 (4): 501-505, 2001.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S.; FELICIO, L. F. A role for the periaqueductal grey in opioidergic inhibition of maternal behaviour. **Eur J Neurosci.**, 18 (3): 667-674, 2003.

MOISEWITSCH, J.R.D.; LAUDER, J.M. Stimulation of murine tooth development in organotypic culture by the neurotransmitter serotonin. **Arch. Biol. Oral**, v. 41, p. 161-165, 1996.

MORGANE, P.J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.J.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DIAZ CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci. Behav. Rev.**, v. 17, p. 91-128, 1993.

- MORGANE, P.J.; MILLER, M.; KEMPER, T.; STERN, W.; FORBES, W.; HALL, R.; BRONZINO, J.; KISANE, E.; HAWRYLEWICZ, E.; RESNICK, O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neurosci. Behav. Rev.**, v.2, 1978.
- NELSON, E.; PANKSEPP, J. Oxytocin mediates acquisition of maternally associated odor preferences in preweanling rat pups. **Behavioral Neuroscience**, 110: 583-592, 1996.
- NEVILLE, K.R.; HABERLY, L.B. Olfactory cortex. In: SHEPHERD, G.M. (ed). **The Synaptic Organization of the Brain**. Oxford University Press, 2004.
- NUMAGANI, Y.; ZUBROW, A.B.; MISHRA, O.P.; DELIVORIA-PAPADOPOULUS, M. Lipid free radical generation and brain cell membrane alteration following nitric oxide synthase inhibition during cerebral hypoxia in the newborn piglet. **J Neurochem.**, 69: 1542 – 1547, 1997.
- NUMAN, M. Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants. **Behav. Cogn. Neurosci. Rev.**, 5: 163 – 190, 2006.
- NUMAN, M. Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. **Dev. Psychobiol.**, 49: 12 – 21, 2009.
- NUMAN, M. Maternal behavior. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 2: 221-302, 1994.
- NUMAN, M. Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 87: 746-759, 1974.
- NUMAN, M. Neural basis of maternal behavior in the rat. **Psychoneuroendocrinology**, 13: 47 – 62, 1988.
- NUMAN, M.; CALLAHAN, E.C. The connections of the medial preoptic region and maternal behavior in the rat. **Physiology & Behavior**, 25: 653-665, 1980.
- NUMAN, M.; CORODIMAS, K.P. The effects of paraventricular hypothalamic lesions on maternal behavior in rats. **Physiology & Behavior**, 35: 417-425, 1985.
- NUMAN, M.; CORODIMAS, K.P.; NUMAN, M.J.; FACTOR, E.M.; PIERS, W.D. Axon-sparing lesions of the preoptic region and substantia innominate disrupt maternal behavior in rats. **Behavioral Neuroscience**, 102: 381-396, 1988.
- NUMAN, M.; INSEL, T.R. **The neurobiology of parental behavior**. New York: Springer, 2003. 419 p.
- NUMAN, M.; NUMAN, M.J.; ENGLISH, J.B. Excitotoxic amino acid injections into the medial amygdala facilitate maternal behavior in virgin female rats. **Hormones and Behavior**, 27: 56-81, 1993.
- NUMAN, M.; ROSENBLATT, J.S.; KOMISARUK, B.R. Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 91: 146-164, 1977.

- NUMAN, M.; SHEEHAN, T. P. Neuroanatomical circuitry for mammalian maternal behavior. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 807: 101 – 125, 1997.
- NUMAN, M.; STOLZENBERG, D.S. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. **Front Neuroendocrinol**, 30: 46–64, 2009.
- OLSON, L.; SEIGER, A. Early prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: fluorescence histochemical observations. **Z Anat Entwicklungsgesch**, 137: 301–316, 1972.
- OO, T.F.; BURKE, R.E. The time course of the developmental cell death in phenotypically defined dopaminergic neurons of the substantia nigra. **Dev Brain Res**, 98: 191–196, 1997.
- OTTONI, E.B., Etholog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation session. **Behavior Research Methods**, 32 (3): 446-449, 2000.
- PASCUAL-LEONE, A.; AMEDI, A.; FREGNI, F.; MERABET, L.B. **Annu Rev Neurosci.**, v. 28, p. 377 – 401, 2005.
- PEDERSEN, C. A. Oxytocin control of maternal behavior. Regulation by sex steroids and offspring stimuli. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 807: 126–145, 1997.
- PEDERSEN, C. A., CALDWELL, J. D., WALKER, C., AYERS, G.; MASON, G. A. Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental and medial preoptic areas. **Behav. Neurosci.**, 108: 1163–1171, 1994.
- PEDERSEN, C. A.; ASCHER, J. A.; MONROE, Y. L.; PRANGE, A. J. Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats. **Science**, 216: 648–649, 1982.
- PEDERSEN, C. A.; PRANGE, A. J. Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 76: 6661 – 6665, 1979.
- PEDERSEN, C.A. Oxytocin control of maternal behavior. Regulation by sex steroids and offspring stimuli. **Ann. NY Acad. Sci.** 126–45, 1995.
- PETERS, D.A. Both prenatal and postnatal effects of maternal stress on offspring behavior and central 5-hydroxytryptamine receptors in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 30: 669–673, 1988.
- POWER, K.L.; MOORE, C.L. Prenatal stress eliminates differential maternal attention to male offspring in Norway rats. **Physiology and Behavior**, 38: 667 - 671, 1986.
- RAMAGE, A.G.; VILLALON, C.M. 5-Hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. **Trends Pharmacol Science**, 29: 472 – 481, 2008.
- ROOHEY T, RAJU TN, MOUSTOGIANNIS AN. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis. **Early Hum Dev.**, 47 (2): 115-46, 1997.

ROSENBLATT, J. S. Psychobiology of maternal behavior: contribution to the clinical understanding of maternal behavior among humans. *Acta Paediatr. Suppl.*, 397: 3 – 8, 1994.

ROSENBLATT, J.S.; MAYER, A.D. An analysis of approach/withdrawal processes in the initiation of maternal behavior in the laboratory rat. In: HOOD, KE.; GREENBERG, G.; TOBACH, E. (Eds.) . **Handbook of Behavioral Neurobiology**, vol, 7. New York: Plenum Press, 1995.

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

SAKUMA, Y. Neural Substrates for sexual preference and motivation in the female and male rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1129: 55-60, 2008.

SAKUMA, Y.; PAFF, D.W. Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat. *Am J Physiol*, 237: 278-84, 1979.

SEIGER, A.; OLSON, L. Late prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: fluorescence histochemical observations. *Z Anat Entwicklungsgesch*, 140:2 81–318, 1973.

SHUEY, D.L.; SADLER, T.W.; TAMIR, H.; LAUDER, J.M. Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. *Anat. Embryol.*, v. 187, p. 75 – 85, 1993.

SHUEY, D.L.; SADLER, T.W.; TAMIR, H.; LAUDER, J.M. Serotonin as a regulator of morphogenesis: site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors. *Teratology*, v. 46, p. 367–378, 1992.

SIEGEL, H.I.; ROSENBLATT, J.S. Hormonal and behavioral aspects of maternal care in the hamster: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 41: 17-26, 1980.

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

SMART, J.L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res.*, v. 28, p. 85-95, 1971.

STERN, J.M. Somatosensation and maternal care in Norway rats. In: SLATER, P.J.; ROSENBLATT, J.S.; SNOWDEN, C.T. (Eds.). **Parental care: Evolution, mechanisms, and adaptive significance: advances in the study of parental behavior**. New York: Academic Press, 1996.

STERN, J.M. Offspring induced nurturance: animal – human parallels. *Dev. Psychobiol.*, 31: 19 – 37, 1997.

STERN, J.M. Protomastro, Effects of low dosages of apomorphine on maternal responsiveness in lactating rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 66: 353-359, 2000.

STERN, J.M.; DIX, L.; BELLOMO, C.; THRAMANN, C. Ventral trunk somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. II. Role of nipple and surrounding sensations. **Psychobiology** 20:71– 80, 1992.

STERN, J.M.; JOHNSON, S.K. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats: I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. **Physiology & Behavior**, 47: 993–1011, 1990.

STERN, J.M.; LEVINE, S. Pituitary-adrenal activity in the post-partum rat in the absence of suckling stimulation. **Hormonal Behavior**, 3: 237–246, 1972.

SUKIKARA, M. H.; MOTA-ORTIZ, S. R.; BALDO, M. V.; FELICIO, L. F.; CANTERAS, N. S. A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. **J Neurosci.**, 26 (9): 2583-2589, 2006.

SUKIKARA, M. H.; MOTA-ORTIZ, S. R.; FELICIO, L. F.; CANTERAS, N. S. The periaqueductal gray and its potential role in maternal behavior inhibition in response to predatory threat. Program No. 595.2/UU54. 2008 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008. Online.

SUKIKARA, M. H.; PLATERO, M.D.; CANTERAS, N. S.; FELICIO, L. F. Opiate regulation of behavioral selection during lactation. **Pharmacol Biochem Behavior**, 87: 315-320, 2007.

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

TOTH, G.; FEKETE, M. 5-hydroxyndole acetic excretion in newborns, infants and children. **Acta Paediatr. Hung.**, v. 27, p. 221–226, 1986.

VANNUCCI, R.C. Experimental models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage, **APMIS**, 40: 89-95, 1993.

VANNUCI, S.; HAGBERG, H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. **J Exp Biol.**, 207: 3149 – 3154, 2004.

VENKATESAN, A.; FRUCHT, S. Movement disorders after resuscitation from cardiac arrest. **Neurol Clin**, 24: 123 – 132, 2006.

VITALIS, T.; PARNAVELAS, J.G. The role of serotonin in early cortical development. **Dev. Neurosci.**, 25: 246–255, 2003.

VOLPE, J. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. **Mental Retard Dev Disabil Res.**, 7: 56 – 64, 2001.

VOORN, P.; KALSBECK, A.; JORRITSMA-BYHAM, B.; GROENEWEGEN, H.J. The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. **Neuroscience**, 25: 857–887, 1988.

WEAVER, I.C.; GRANT, R.J.; MEANEY, M.J. Maternal behavior regulates long-term hippocampal expression of BAX and apoptosis in the offspring. *J. Neurochem.*, 82: 998–1002, 2002.

WHITAKER–AZMITIA, P.M. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res. Bull.*, v. 56, p. 479–485, 2001.

WINICK, M.; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J. Nutr.*, v. 89, p. 300, 1966.

YAN, W.; WILSON, C.C.; HARING, J.H. Effects of neonatal serotonin depletion on the development of rat dentate granule cells. *Dev. Brain Res.*, v. 98, p. 177–184, 1997.

ZHANG, T.Y.; CHRÉTIEN, P.; MEANEY, M.J.; GRATTON, A. Influence of naturally occurring variations in maternal care on prepulse inhibition of acoustic startle and the medial prefrontal cortical dopamine response to stress in adult rats. *J. Neurosci.*, 25 (6): 1493–502, 2005.

10 ANEXOS



Dynamics of mother-pup interactions: tradeoff between environment and physiology

Renata Gonçalves Vasconcelos, Marianne Orlandini Klein, Aline Mello Cruz and Luciano Freitas Felício

Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Abstract

The emergence and maintenance of maternal behavior are under the influence of environmental cues such as light and dark periods. This article discusses the characteristic neurobiology of the behavioral patterns of lactating rats. Specifically, the hormonal basis and neurocircuits that determine whether mother rats show typical sequential patterns of behavioral responses are discussed. During lactation, rats express a sequential pattern of behavioral parameters that may be determined by hormonal variations. Sensorial signals emitted by pups, as well as environmental cues, are suggested to serve as conditioned stimuli for these animals. Finally, the expression of maternal behavior is discussed under neuroeconomic and evolutionary perspectives.

Keywords: maternal behavior, hormones, light/dark cycle

Received 14 May 2012; received in revised form 23 July 2012; accepted 9 August 2012. Available online 28 December 2012.

Introduction

The influence of circadian factors on the modulation of maternal behavior is poorly understood. Particularly interesting is how circadian factors such as daylight interact with hormonal changes during late pregnancy and early lactation. The activation of biochemical and neural pathways modulates systems that are influenced by environmental factors during this critical period in the female organism, generating important behavioral changes. The intensity by which some hormone levels are influenced by circadian, endogenous, and environmental cues varies according to the physiological state (Bridges et al., 1993). Hormonal changes occur during late pregnancy, determining the onset of maternal behavior (Bridges, 1984). Two heuristically significant paradigms are involved in this context: pregnancy-induced changes in grooming patterns (in which female rats increase the time spent licking their mammary glands; Serafim and Felício, 2002) and the opioidergic-progesterone interplay by the end of pregnancy, generating tardive influences on nursing (Cruz et al., 2010, 2011; Sukikara et al., 2011). Among the hormones involved in these processes are estrogen, progesterone, prolactin,

oxytocin, vasopressin, corticosterone, cholecystokinin (CCK), and β -endorphin (Felício et al., 1991; Mann et al., 1995). Circadian variations in serum levels have been described for some of these hormones, whereas the expression of these rhythms is modulated by the reproductive physiological state (Bridges et al., 1993; Wharfe et al., 2011).

The complexity of the interplay between endocrinology and ethology affords a rich source of information about the role of behavior in modifying the internal environment. Some neuroethological approaches in which naturally occurring patterns of behavior generate functional changes in neural pathways allow the investigation of how they can influence endocrine function. Therefore, this review discusses the circadian influences on hormones and its correlation with maternal behavior. Possible neural sites and mechanisms that determine such influences are discussed. Finally, research perspectives in this area are discussed in an evolutionary–developmental (*evo-devo*) context.

Hormones: Role in Maternal Behavior and Their Rhythms

Hormonal changes that occur during late pregnancy and lactation, such as changes in the levels of estrogen, progesterone, prolactin, oxytocin, β -endorphin, vasopressin, and CCK, are needed for the establishment and expression of maternal behavior. These hormones interact with other hormones and neurotransmitters, influencing various aspects of reproductive physiology. Usually the final behavioral output observed is a consequence of the sequential or simultaneous actions of various hormones.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; Pathology Department, University of São Paulo School of Veterinary Medicine, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 Cidade Universitária, São Paulo, 05588-270 Brazil

Correspondence regarding this article should be directed to: Luciano F. Felício, Phone: +55 11 3091-7934. Fax: +55 11 3091-7829. E-mail: lfelicio@usp.br

Thus, some hormones may be mentioned in sections that discuss other hormones. This occurs when their interactions are functionally relevant.

Progesterone

Progesterone is important for the maintenance of pregnancy and also influences maternal behavior. Serum concentrations of this hormone remain elevated during most of the pregnancy, and the levels drop abruptly before parturition. These temporal changes in progesterone concentrations appear to play a role in the induction of the expression of maternal behavior. Recently, our group described an interesting relationship between progesterone and opioids in the control of maternal behavior in which we investigated the endocrine aspects of this animal model. Serum corticosterone, progesterone, estradiol, and prolactin concentrations were measured after each morphine injection from day 17 to day 21 of pregnancy. No significant differences were found in serum corticosterone, estradiol, or prolactin concentrations. However, progesterone concentrations significantly increased from day 18 to day 20 (Sukikara et al., 2011). Another experiment investigated the effects of daily progesterone injections during the same period on the sensitivity to the inhibitory effects of morphine on maternal behavior during lactation. Progesterone-pretreated dams were more sensitive to the opioidergic inhibition of maternal behavior (Cruz et al., 2011). This effect is similar to that observed in morphine-pretreated animals, suggesting that increased progesterone concentrations may account for the behavioral effects observed in lactating rats treated with morphine during pregnancy (Felicio and Canteras, 2008). Thus, the interaction between endogenous opioids and progesterone may play a role in programming the brain to optimize adaptation to the post-partum environment by the mother and offspring.

Prolactin

Prolactin is a phylogenetically ancient hormone. The diversity of action of prolactin involves osmoregulation, amphibian metamorphosis, control of immune responses and inflammation, luteotrophic and luteolytic actions, and some centrally mediated phenomena such as stimulation of the production and secretion by the pigeon "crop sac" and the regulation of sexual behavior and parental behavior (Nasello and Felicio, 1991; Carvalho-Freitas et al., 2011). By acting centrally, prolactin facilitates maternal behavior by acting on prolactin receptors in the medial preoptic area (MPOA). More than one kinetic mechanism may allow prolactin to reach this locus (Felicio and Bridges, 1992). Central prolactin originates from the pituitary and reaches central loci that are sensitive to maternal behavior by spreading from the hypophyseal portal tuberal system and may be actively transported through the choroid plexus, reaching the ventricular system and then spreading throughout the central nervous system. Prolactin may also be synthesized in the central

nervous system and might be involved in neurogenesis and maternal memory. Although the functional meaning of such findings with regard to maternal behavior remains to be investigated, the physiological conditions and time periods when prolactin interferes with brain function and behavior are the major factors that determine prolactin-behavioral interactions.

Cholecystokinin

Neuronal CCK is, in its majority, the sulfated terminal octapeptide CCK8. A small fraction the four amino acid final sequence CCK4, which is identical to gastrin terminal, is present in the central nervous system as well. The function of CCK varies according to specific CCK pathways and specific brain regions. It has also met several criteria to be designated a neurotransmitter. The distribution of CCK8 within the hypothalamus and limbic system overlaps with steroid-concentrating regions. The central concentrations of CCK8 appear to depend on gonadal hormones because gonadectomy induced a clear decrease in CCK. In the amygdala and ventromedial hypothalamic nucleus, CCK concentrations vary according to the phase of the estrous cycle. Postprandial CCK release increases during pregnancy (Uvnas-Moberg, 1989). In addition to central CCK transmission, peripheral signals of this hormone can trigger subdiaphragmatic terminals of the vagus nerve. Suckling-induced CCK release appears to be vagal nerve-mediated. Abdominal vagotomy blocked the suckling-induced release of CCK. Cholecystokinin also blocked the opioid-induced inhibition of maternal behavior, especially when it was administered directly in the preoptic area (POA) and lateral periaqueductal gray (IPAG; Felicio et al., 1991; Mann et al., 1995; Miranda-Paiva et al., 2007). Both CCK1 and CCK2 (previously referred to as CCKA and CCKB) receptor antagonists potentiate the inhibitory effects of morphine on ongoing maternal behavior. This is consistent with previous results that demonstrated antagonistic effects of CCK and β -endorphin on this behavior. These results suggest that both CCK receptor subtypes might be involved in this multiple peptidergic control of maternal behavior in lactating rats. We also found that pretreatment with the CCK1 receptor antagonist lorglumide during late pregnancy disrupted maternal behavior in rats (Miranda-Paiva et al., 2002).

Curiously, neuronal CCK and dopamine are negatively correlated with circadian rhythms. Circadian variations in cholecystokinin and dopamine in the limbic system present distinct harmonic circadian rhythms (12 h, 6 h). Cholecystokinin decreases during the light phase and reaches a peak during the dark phase, and the opposite was found for dopamine. Thus, CCK/dopamine rhythms are negatively correlated, and the differences were significant at 11:00 AM, 1:00 PM, 9:00 PM, and 3:00 AM. These results indicate that circadian processes are involved in the neuronal transmission of CCK and dopamine (Schade et al., 1993). The same authors

suggested the existence of a close interaction between CCK and dopamine in various areas of the rat brain, independent of colocalization (Schade et al., 1995).

Opioids

Morphine, the typical opioid agonist, inhibits maternal behavior in lactating rats (Bridges and Grimm, 1982). The modulatory effects of opioids on maternal behavior are plastic and adaptive. Both tolerance (for its sedative effects) and reverse tolerance and sensitization (for its excitatory and addictive effects) have been well described (Miranda-Paiva et al., 2001; Cruz et al., 2010). The plasticity of opioid transmission is important for the versatility and adaptation necessary for a lactating mother. Opioid stimulation that has inhibitory effects on maternal behavior may stimulate foraging in adult mothers (Sukikara et al., 2006, 2007). Because the expression of these behaviors can be influenced by circadian rhythms, investigations of how decision-making is influenced by opioidergic stimulation in lactating rats are worthwhile.

Every mother must engage in survival issues where she must weigh the trade-offs between subsistence and reproduction. Recent data have begun to uncover the adaptive mechanisms that increase the chances of survival of lactating animals in various environments. Endogenous opioids may stimulate hunting by superseding maternal behavior during lactation, and mechanisms that involve opioidergic transmission during pregnancy and lactation might be reproductively meaningful. Thus, opioidergic transmission may play a role in the regulation of behavioral selection during lactation (Sukikara et al., 2007; Cruz et al., 2010). The onset of maternal behavior is closely related to the action of opioids in the MPOA during lactation. Immunohistochemical and pharmacological studies suggested the importance of the IPAG in the opioidergic inhibition of maternal behavior. The activation of other regions of the PAG is important for the postural kyphosis reflex that optimizes breastfeeding. Therefore, some questions emerge. Does the PAG play a role in breastfeeding cycles in the absence of predators or prey? Would such mechanisms play a role in the basic physiology of mother-infant interactions? Knowledge of the emergence and maintenance of maternal behavior and how it is controlled by interactions among environmental, biochemical, hormonal, and neural factors is highly relevant.

Functional Neuroanatomy of Maternal Behavior

Inhibitory pathways

The activity of inhibitory pathways prevents the expression of maternal behavior in virgin mammals. In virgin females, the major sensorial input that triggers such inhibition is the odor stimuli from a newborn. The olfactory input goes from the olfactory bulb to the medial amygdala. From the medial amygdala, some neurons project to the anterior hypothalamic area (AHA) and ventromedial hypothalamic nucleus (VMN).

Other amygdala neurons project to the MPOA and bed nucleus of the stria terminalis (BNST). Therefore, the lack of maternal behavior observed in virgin rats may be attributable to exposure to pup-related odors that directly inhibits the MPOA/BNST. Alternatively, pup odors might activate brain regions that play an essential positive role in maternal behavior. The lack of expression of maternal behavior in virgin rats may be attributable to the inhibitory tone of projections from the medial amygdala to AHA/ventral medial nucleus. Medial amygdala projections to the MPOA/BNST appear to be functionally relevant for the expression of maternal behavior in lactating females (Sheehan et al., 2001). The AHN and VMN project to the PAG. Because the PAG is involved in the regulation of anxiety-like, fear, and escape behavior, activation of this structure may lead to avoidance/escape responses and other processes that prevent a maternal response. Thus, the PAG plays a dual role in which the dorsal PAG (dPAG), apart from organizing defensive responses, also appears to account for the behavioral inhibition of nondefensive responses such as maternal behavior (Sukikara et al., 2010).

Activation pathways

Medial preoptic area and ventral BNST (vBNST) neurons promote maternal behavior. Efferents from these regions project to the lateral septum (LS), shell region of the nucleus accumbens, AHN, VMN, ventral tegmental area (VTA), PAG, and retrorubral field (for review, see Numan, 2006).

Data from the literature support the hypothesis that the acute behavioral effects of dopamine receptor antagonists on maternal behavior are attributable to dopamine receptor blockade in the nucleus accumbens. Thus, limbic dopaminergic pathways play a role in ongoing maternal behavior (Silva et al., 2001, 2003). Projections from MPOA/vBNST neurons to the lateral septum (LS) appear to have functional implications in terms of promoting maternal behavior (Numan, 2006). Fos-expressing MPOA and vBNST neurons are activated during maternal behavior. Such MPOA neurons project to the VTA and LS and the medial hypothalamic region (Numan, 2006).

Maternal behavior that is indirect or not directed to the pup

The female brain undergoes significant reorganization toward motherhood. Neonates benefit from the mother's behavioral changes. Some of these changes, such as modifications of grooming patterns and nest building, begin to occur during pregnancy. Indirect maternal behaviors also include maternal aggression. Grooming behavior varies according to the female endocrine milieu. During pregnancy, female rats change their grooming patterns, tending to lick their mammary glands more than prior to pregnancy (Roth and Rosenblatt, 1966; Serafim and Felicio, 2002). This in turn has been shown to be important for mammary gland development and

lactation. Thus, self-licking of the mammary glands is important for good lactation. Because mammary gland grooming is necessary for good lactation, its modulation might be part of a physiological process that leads to the optimization of the entire reproductive phenomenon. To be reproductively successful, mammals present different behavioral strategies.

Behaviors displayed during the first days immediately before and after parturition that are preparatory to the arrival of the young, such as nest building and threatening conspecifics in the case of maternal aggression, are considered to involve mechanisms that affect other behavioral systems that impact the mother's responses to their young including affect, attention, perception, behavioral flexibility, and learning.

Perspectives

Neuroeconomics in an evo-devo context

Evo-devo is a branch of biology that investigates the links between evolution and the development of different organisms. Analyzing maternal behavior in such a context is worthwhile and appears to have heuristic value. Exposure to peripuberal unbalanced diets can modify the formation of neuroendocrine systems, leading to dysfunction in adulthood, and predispose the body to serious diseases such as diabetes, obesity, and affective disorders (Sisk and Zehr, 2005). Studies in mice with induced obesity suggested that the developmental period between 3 and 5 weeks of age is critical to the propensity to diet-induced obesity (Ikenasio-Thorpe et al., 2007). An evo-devo overview is particularly helpful for coalescing a variety of multifactorial aspects including relevant development and phylogenetic aspects of the placenta and the immune and nervous systems. Evo-devo is also important with regard to the applicability of certain animal models to particular aspects of placental anatomy and physiology.

Achieving the best balance between subsistence and reproduction is one of the most important challenges for female mammals. Environmental perils and food availability must be considered and perhaps anticipated correctly. Thus, strong evolutionary pressure is placed on females to select those that are best able to exercise this balance. During pregnancy and after delivery, the central nervous system undergoes significant adjustments, with sensory and cognitive changes that result from changes in the intensity of the activation of circuits and formation of new connections. In addition to expressing maternal behavior toward their offspring, lactating females must also assess the risks and seek food in general, thus enabling their own subsistence. Understanding of the neural basis of these adjustments has been increased by the work of Kinsley and colleagues whose studies have described the positive effects of maternity on learning and memory (Kinsley et al., 1999; Kinsley and Amory-Meyer, 2011; Zimmerknopf et al., 2011). Maternal care is a specific behavior for each species. Mental processes that involve the brain cortex are markedly different

among lower species. Studies in lower animals related to cognitive function are not as likely to be helpful as those related to emotional disorders such as anxiety problems or depression or memory disorders related to the hippocampus. Cognition is associated with the human cortex that developed during a recent brief period of evolution, whereas emotion and memory are associated with brain structures that have not substantially changed over long evolutionary periods between lower and higher species. The emergence and maintenance of maternal behavior are controlled by interactions between environmental, biochemical, hormonal, and neural factors (Numan and Woodside, 2010).

Role of reproductive immunology

Mammalian reproduction may be considered an immunological paradox. A pregnant female must adapt her immunological system to hold a developing fetus. The uterus is the very first environment to which one must adapt. Reproductive experience has been shown to generate functional changes in the immune system. Multiparous female rats generally show greater resilience to stress, decreased anxiety, and better memory ability than female rats that have never experienced motherhood (Kinsley et al., 1999). Moreover, neural changes remain long after the last pregnancy. Among the modifications related to reproductive experience are behavioral, neural, and neuroendocrine changes in rodents. The time of day induces changes in dopamine-related behavioral, neurochemical, and endocrine responses. Yawning and stereotypy induced by the dopamine receptor agonist apomorphine change according to the time of day and previous reproductive experience (Byrnes et al., 2001; Hucke et al., 1998; Zimmerknopf et al., 2011; Nasello et al., 1995). Studies of striatal and hypothalamic neurotransmitter concentrations during daylight hours have shown that reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats (Felicio et al., 1996; Sider et al., 2003). Prolactin has also been identified as a possible immunoregulatory factor in rodents. Lactation was recently shown to strongly affect the immune system in laboratory rats, but the impact on blood and mesenteric lymph nodes varies (Jaedicke et al., 2009). The activity of peritoneal macrophages in lactating rats may be modulated by prolactin and caused by dopamine receptor blockade. The intensity and direction of this change depends on the time of incubation and previous reproductive experience in females. These data suggest that reproductive experience is associated with a reduction of serum prolactin levels. Cells in experienced female organisms, including macrophages, also become more sensitive to the effects of prolactin. The possibility that reproductive experience-induced changes in the neuroendocrine and immune systems in female rats play a role during lactation appears likely. Future studies are necessary to investigate the direct and indirect impacts of immunological processes on the expression of maternal behavior.

In summary, environmental factors such as the light/dark cycle and food availability interact with endogenous cues such as hormonal variations, immunological function, and neuronal activation to influence postpartum behaviors. The way in which these interactions occur is a major field of basic and translational investigation. This research approach may place maternal behavior in a more appropriate neuroethological context.

Acknowledgments

This study was supported by FAPESP (grant #2010/50415-4) and a fellowship awarded to RGV (#09/51276-0).

References

- Bridges, R. S. (1984). A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence, and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat. *Endocrinology*, *114*, 930-940.
- Bridges, R. S., Felicio, L. F., Pellerin, L. J., Stuer, A. M., & Mann, P. E. (1993). Prior parity reduces post-coital diurnal and nocturnal prolactin surges in rats. *Life Sciences*, *53*, 439-445.
- Bridges, R. S., & Grimm, C. T. (1982). Reversal of morphine disruption of maternal behavior by concurrent treatment with the opiate antagonist naloxone. *Science*, *218*, 166-168.
- Byrnes, E. M., Byrnes, J. J., & Bridges, R. S. (2001). Increased sensitivity of dopamine systems following reproductive experience in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *68*, 481-489.
- Carvalho-Freitas, M. I. R., Anselmo-Franci, J. A., Maiorka, P. C., Palermo-Neto, J., & Felicio, L. F. (2011). Prolactin differentially modulates the macrophage activity of lactating rats: Possible role of reproductive experience. *Journal of Reproductive Immunology*, *89*, 38-45.
- Cruz, A. M., Maiorka, P. C., Canteras, N. S., Sukikara, M. H., & Felicio, L. F. (2010). Morphine treatment during pregnancy modulates behavioral selection in lactating rats. *Physiology and Behavior*, *101*, 40-44.
- Cruz, A. M., Sukikara, M. H., Felipe, E. C. G., Anselmo-Franci, J. A., Canteras, N. S., Oliveira, C. A., & Felicio, L. F. (2011). Opioidergic modulation of maternal behavior in rats: A role for progesterone. *Society of Neuroscience Abstracts*, *36*, 17/SS20.
- Felicio, L. F., Mann, P. E., & Bridges, R. S. (1991). Intracerebroventricular cholecystokinin infusions block beta-endorphin-induced disruption of maternal behavior. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *39*, 201-204.
- Felicio, L. F., & Bridges, R. S. (1992). Domperidone induces a probenecid-sensitive rise in immunoreactive prolactin in cerebroventricular perfusates in female rats. *Brain Research*, *573*, 133-138.
- Felicio, L. F., Florio, J. C., Sider, L. H., Cruz-Casallas, P. E., & Bridges, R. S. (1996). Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. *Brain Research Bulletin*, *40*, 253-256.
- Hucke, E. E., Cruz-Casallas, P. E., Sider, L. H., & Felicio, L. F. (2001). Reproductive experience modulates dopamine-related behavioral responses. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *68*, 575-582.
- Hucke, E. E., Cruz-Casallas, P. E., Florio, J. C., & Felicio, L. F. (1998). Reproductive experience reduces striatal dopaminergic responses in freely moving female rats. *Neuroreport*, *9*, 3589-3593.
- Ikenasio-Thorpe, B. A., Breier, B. H., Vickers, M. H., & Fraser, M. (2007). Prenatal influences on susceptibility to diet-induced obesity are mediated by altered neuroendocrine gene expression. *Journal of Endocrinology*, *193*, 31-37.
- Jaedicke, K. M., Fuhrmann, M. D., & Stefanski, V. (2009). Lactation modifies stress-induced immune changes in laboratory rats. *Brain Behavior and Immunity*, *23*, 700-708.
- Kinsley, C. H., Madonia, L., Gifford, G. W., Tureski, K., Griffin, G. R., Lowry, C., Williams, J., Collins, J., Mclearie, H., & Lambert, K. G. (1999). Motherhood improves learning and memory. *Nature*, *402*, 137-138.
- Mann, P. E., Felicio, L. F., & Bridges, R. S. (1995). Investigation into the role of cholecystokinin (CCK) in the induction and maintenance of maternal behavior in rats. *Hormones and Behavior*, *29*, 392-406.
- Miranda-Paiva, C. M., Nasello, A. G., Yin, A. J., & Felicio, L. F. (2002). Puerperal blockade of cholecystokinin (CCK) receptors disrupts maternal behavior in lactating rats. *Journal of Molecular Neuroscience*, *18*, 97-104.
- Miranda-Paiva, C. M., Canteras, N. S., Sukikara, M. H., Nasello, A. G., Macrowiak, I. I., & Felicio, L. F. (2007). Periaqueductal grey cholecystokinin infusions block morphine-induced disruption of maternal behavior. *Peptides*, *28*, 657-662.
- Miranda-Paiva, C. M., Nasello, A. G., Yin, A. J., & Felicio, L. F. (2001). Morphine pretreatment increases opioid inhibitory effects on maternal behavior. *Brain Research Bulletin*, *55*, 501-505.
- Nasello, A. G., & Felicio, L. F. (1991). Prolactin molecular biology and behavioral effects. *Ciência e Cultura*, *43*, 432-438.
- Nasello, A. G., Tieppo, C. A., & Felicio, L. F. (1995). Apomorphine-induced yawning in the rat: Influence of fasting and time of day. *Physiology and Behavior*, *57*, 967-971.
- Numan, M. (2006). Maternal behavior. In: Knobil, E., & Neill, J. D. (Eds.), *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, 3rd edition. Amsterdam: Raven Press. p. 221-302.
- Numan, M., & Woodside, B. (2010). Maternity: neural mechanisms, motivational processes, and physiological adaptations. *Behavioral Neuroscience*, *124*, 715-741.
- Roth, L. L., & Rosenblatt, J. S. (1966). Mammary glands of pregnant rats: Development stimulated by licking. *Science*, *151*, 1403-1404.
- Sider, L. H., Hucke, E. E., Florio, J. C., & Felicio, L. F. (2003). Influence of time of day on hypothalamic monoaminergic activity in early pregnancy: Effect of a previous reproductive experience. *Psychoneuroendocrinology*, *28*, 195-206.
- Silva, M. R., Bernardi, M. M., & Felicio, L. F. (2001). Effects of dopamine receptor antagonists on ongoing maternal behavior in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *68*, 461-468.
- Silva, M. R., Bernardi, M. M., Cruz-Casallas, P. E., & Felicio, L. F. (2003). Pimozide injections into the nucleus accumbens disrupt maternal behaviour in lactating rats. *Pharmacology and Toxicology*, *93*, 42-47.
- Sisk, C. L., & Zehr, J. L. (2005). Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *26*, 163-174.
- Serafini, A. P., & Felicio, L. F. (2002). Reproductive experience influences grooming behavior during pregnancy in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *35*, 391-394.
- Schade, R., Vick, K., Sohr, R., Ott, T., Pfister, C., Bellach, J., Mattes, A., & Lemmer, B. (1993). Correlative circadian rhythms of cholecystokinin and dopamine content in nucleus accumbens and striatum of rat brain. *Behavioural Brain Research*, *59*, 211-214.
- Schade, R., Vick, K., Ott, T., Sohr, R., Pfister, C., Bellach, J., Golor, G., & Lemmer, B. (1995). Circadian rhythms of dopamine and cholecystokinin in nucleus accumbens and striatum of rats: influence on dopaminergic stimulation. *Chronobiology International*, *12*, 87-99.
- Sheehan, T., Paul, M., Amaral, E., Numan, M. J., & Numan, M. (2001). Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats. *Neuroscience*, *106*, 341-356.
- Sukikara, M. H., Mota-Ortiz, S. R., Baldo, M. V., Felicio, L. F., & Canteras, N. S. (2006). A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. *Journal of Neuroscience*, *26*, 2583-2589.
- Sukikara, M. H., Platero, M. D., Canteras, N. S., & Felicio, L. F. (2007). Opiate regulation of behavioral selection during lactation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *87*, 315-320.
- Sukikara, M. H., Mota-Ortiz, S. R., Baldo, M. V., Felicio, L. F., & Canteras, N. S. (2010). The periaqueductal gray and its potential role in maternal behavior inhibition in response to predatory threats. *Behavioural Brain Research*, *209*, 226-233.
- Sukikara, M. H., Cruz, A. M., Felipe, E. C., Anselmo-Franci, J. A., Canteras, N. S., de Oliveira, C. A., & Felicio, L. F. (2011). Morphine-induced changes in opioid sensitivity in postpartum females: a unique progesterone response. *Journal of Neuroendocrinology*, *23*, 1134-1138.
- Uvnäs-Moberg, K. (1989). Physiological and psychological effects of oxytocin and prolactin in connection with motherhood with special reference to food intake and the endocrine system of the gut. *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum*, *583*, 41-48.
- Wharfe, M. D., Mark, P. J., & Waddell, B. J. (2011). Circadian variation in placental and hepatic clock genes in rat pregnancy. *Endocrinology*, *152*, 3552-3560.
- Zimberknopf, E., Xavier, G. F., Kinsley, C. H., & Felicio, L. F. (2011). Prior parity positively regulates learning and memory in young and middle-aged rats. *Comparative Medicine*, *61*, 366-377.

EFEITOS PRÉ-NATAIS DA SERTRALINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO SOMÁTICOS DE RATOS NEONATOS

Renata Gonçalves de Vasconcelos¹, Vânia Gomes de Moura-Mattaraia²,
Maria Inês Nogueira¹, Maria Martha Bernardi³, Raul Manhães-de-Castro⁴

- 1 Departamento de Anatomia – Instituto de Ciências Biomédicas III, Universidade de São Paulo, Brasil
- 2 Instituto Butantan, Brasil
- 3 Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, Brasil
- 4 Departamento de Nutrição – Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

Autor para correspondência:
Renata Gonçalves de Vasconcelos
E-mail: redevasconcelos@usp.br

Recebido para publicação: 09/01/2011
Aceito para publicação: 02/01/2012

Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), como a sertralina, têm sido utilizados para induzir atividade serotoninérgica no cérebro. Neste trabalho, são estudados os efeitos pré-natais da sertralina sobre o desenvolvimento e crescimento somáticos de ratos neonatos. Ratas fêmeas Wistar foram tratadas com sertralina (Sert, 30 mg/kg, 1 mL/100 g, s.c., n=9) ou água destilada (Control, 1 mL/100 g, s.c., n=7) durante toda a prenhez. Após o nascimento, seis neonatos machos foram selecionados formando cada ninhada. Eles foram divididos em dois grupos (Sert ou Control) de acordo com o tratamento que suas mães receberam. Um investigador "cego" avaliou os parâmetros de crescimento geral do corpo (peso corporal, eixos anterior-posterior e laterolateral do crânio e o eixo anteroposterior do corpo), maturação de características físicas (abertura do pavilhão auditivo, abertura do conduto auditivo, irrupção dos incisivos superiores e inferiores e abertura dos olhos) durante o período de lactação. Os reflexos de preensão palmar, recuperação do decúbito, colocação pelas vibrissas, aversão ao precipício, geotaxia negativa, resposta ao susto e aceleração também foram avaliados. Os resultados indicam que o tratamento crônico com sertralina durante a prenhez de ratas causa danos ao desenvolvimento somático e neuromotor da prole. Esse efeito pode estar associado com alterações no sistema serotoninérgico durante fases precoces do desenvolvimento.

Palavras-chave: Animais Recém-Nascidos; Ratos, crescimento & desenvolvimento, Serotonina, Sertralina

RESUMO

1 INTRODUÇÃO

Em cérebros humanos, os primeiros neurônios serotoninérgicos desenvolvem-se a partir da quinta semana de gestação¹ aumentando rapidamente até a décima semana gestacional²⁻⁴. Por volta da décima quinta semana gestacional, a organização típica dos neurônios serotoninérgicos pode ser vista nos núcleos da rafe⁵. A serotonina (5-HT), os receptores serotoninérgicos e o transportador da 5-HT (5-HTT) podem ser detectados, precocemente, durante os eventos de clivagem e gastrulação em embriões de uma ampla variedade de espécies,

incluindo, golfinhos, peixes, anfíbios, roedores, galinhas e na *Drosophila*^{6,7}. Em todas as espécies estudadas, a atividade serotoninérgica alcança seu pico durante o desenvolvimento em fases precoces, diminuindo progressivamente na vida adulta⁸⁻¹⁰. O papel regulatório da 5-HT sobre a fisiologia e fisiopatologia, bem como sobre aspectos comportamentais, como controle do humor e do apetite, ansiedade e depressão são bastante conhecidos¹¹⁻¹³. A relação da 5-HT com os eventos da embriogênese e crescimento cerebral¹⁰ sugere seu papel neurotrófico¹⁴ sobre o desenvolvimento dos neuroblastos^{15,16}. Consequentemente, qualquer alteração nos níveis da 5-HT durante este período

do pode resultar em alterações do crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso e outros tecidos¹⁷. Os níveis da 5-HT cerebral são regulados por um sistema de recaptação, através do 5-HTT, e por um sistema de degradação através da enzima monoamina-oxidase (MAO). O polimorfismo humano do 5-HTT e da MAO estão associados à depressão e ansiedade^{18,19}. Drogas que atuam nessas duas proteínas são efetivas no tratamento da depressão e em outras doenças psiquiátricas. Estudos sobre comportamentos não adaptativos causados por polimorfismo no 5-HTT e MAO sugerem que níveis alterados da 5-HT no início do desenvolvimento podem afetar o desenvolvimento do cérebro²⁰.

Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) têm sido amplamente utilizados como ferramenta para estudar o sistema serotoninérgico. O mecanismo clássico de ação dessas drogas consiste em bloquear a recaptação da 5-HT pelo 5-HTT na membrana, aumentando assim a disponibilidade sináptica da 5-HT^{21,22}. Além disso, foi demonstrado *in vitro* que essas drogas, independente e seletivamente, atuam como agonistas e antagonistas de uma variedade de neurotransmissores e de neuro-hormônios^{23,24}. Estudos em animais têm demonstrado que o papel da 5-HT durante o desenvolvimento precoce e na vida adulta não são equivalentes. Enquanto o tratamento com ISRS alivia os sintomas da depressão e ansiedade em camundongos adultos, nos recém-nascidos causa aumento de comportamentos não adaptativos que persistem na vida adulta. Ademais, camundongos que tiveram o 5-HTT bloqueados apresentam aumento dos sintomas de ansiedade e depressão^{25,26}. Sabe-se que isso ocorre no cérebro desses animais porque eles foram expostos a altos níveis de 5-HT durante o desenvolvimento. Esses resultados sugerem a existência de um período crítico em que o tratamento com ISRS pode causar modificações duradouras. Esse assunto requer atenção especial, pois os ISRS, que são drogas de escolha no tratamento da depressão em mulheres durante a gestação e amamentação, podem cruzar a barreira placentária e ser excretados no leite materno^{27,28}. Assim, faz-se necessário explorar

para compreender os possíveis efeitos dos ISRS sobre os recém-nascidos.

Muitos estudos têm demonstrado que o tratamento com ISRS reduz a ingestão de alimentos e o peso corporal em ratos^{29,30}. Em nosso laboratório, ratos recém-nascidos tratados com sertralina durante a lactação apresentam mudanças no crescimento e desenvolvimento³¹. Geralmente, o crescimento somático e o peso corporal são prejudicados. No caso do crescimento somático, foram encontradas alterações dose-dependentes no comprimento do corpo e da cauda, bem como nos eixos do crânio³². Mães tratadas com antidepressivos apresentam aumento no número de partos prematuros e abortos, bem como perda de peso corporal^{27,33}. Embora importantes parâmetros de maturação e fisiológicos do corpo sejam governados por fatores genéticos, eles podem ser influenciados pelo sistema serotoninérgico.

O objetivo do presente estudo é investigar os efeitos pré-natais de sertralina sobre o crescimento e desenvolvimento somáticos, bem como a maturação de reflexos, em ratos. Uma vez que, em humanos, o tratamento com antidepressivos faz-se de maneira contínua, as mães, neste estudo, foram tratadas durante a gestação. A dose aqui utilizada (30 mg/kg) foi baseada nos experimentos de Nielsen et al.²⁹ que demonstraram que 32 mg/kg de sertralina foram capazes de diminuir consistentemente o peso corporal de ratos, mas não induziram sinais de toxicidade. A dose foi administrada uma vez ao dia, pois o tempo de meia-vida da sertralina é 6 h. A administração oral de 29.2 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ de sertralina em camundongos reduz o comportamento de *marble-burying* por 1, 4 e 12 h após o tratamento³⁴.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar. Ninhadas foram obtidas de fêmeas nulíparas acasaladas com machos férteis, do biotério do Departamento de

Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco. O início da prenhez foi confirmado pela presença de espermatozoides no lavado vaginal na manhã seguinte ao acasalamento. O tratamento das fêmeas foi iniciado assim que diagnosticada a prenhez pela presença de espermatozoides no lavado vaginal e perdurou durante todo o período gestacional. Durante a prenhez e até o final do experimento, os animais foram mantidos em caixas-moradias de polietileno. Filhotes machos ($n=36$) de diferentes mães foram selecionados e divididos aleatoriamente em três grupos com seis filhotes cada 24 h após o parto. Cada filhote foi marcado na pele com uma solução violeta (cloreto de metilrosanilina) para identificação. Os neonatos foram amamentados até o 21º dia pós – natal (sendo o primeiro dia considerado dia zero). Os animais foram mantidos durante todo o experimento em caixas de polietileno, em sala com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, num ciclo de claro - escuro 12/12 horas, com livre acesso à ração (LABINA - Purina do Brasil S/A) e água. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pernambuco de acordo com o *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*.

2.2 Tratamento farmacológico e grupos experimentais

Os neonatos foram divididos em dois grupos de acordo com o tratamento a que suas mães foram submetidas: sertralina (Sert, 30 mg/kg, 1 ml/100 g, $n=9$) ou água destilada (Control, 1 ml/100 g, $n=7$). As injeções foram realizadas diariamente por via subcutânea às 14 h durante todo o período gestacional (21 dias). A sertralina (sertraline hydrochloride, Pfizer) foi dissolvida e diluída em água destilada.

2.3 Crescimento somático

O progresso de cada animal foi acompanhado longitudinalmente durante o experimento, de acordo com critérios previamente estabelecidos^{31,32}, diariamente, entre 13 e 14 h. O pesquisador não tinha conhecimento da condição em relação à

droga de cada animal. Medidas do peso corporal, eixo anteroposterior do corpo, eixos laterolateral e anteroposterior do crânio foram utilizados para avaliar o crescimento somático. O peso corporal foi mensurado em uma balança (FANEM[®], 100 mg de precisão). O eixo longitudinal do corpo (distância do focinho à ponta da cauda), o eixo laterolateral do crânio (distância entre os pavilhões auriculares direito e esquerdo), o eixo anteroposterior do crânio (distância entre o focinho e a articulação parietoccipital) foram mensurados, utilizando-se um paquímetro (STARRET[®], 0.05 mm de precisão).

2.4 Maturação de características físicas

Características de maturação física foram medidas de acordo com critérios previamente estabelecidos^{31,32,35}. O mesmo protocolo foi adotado para observações do início das seguintes características físicas: abertura do pavilhão auditivo (quando se observou o desdobramento completo dos pavilhões auriculares direito e esquerdo para a posição ereta), abertura do conduto auditivo (abertura do conduto auditivo interno de ambos os pavilhões auriculares), irrupção dos incisivos superiores e inferiores (quando se observou o rompimento da gengiva pelas cúspides dos dentes), abertura dos olhos (quando a membrana que recobre ambos os olhos foi descoberta).

2.5 Ontogênese de reflexos

Os testes reflexos foram realizados diariamente, no período entre 10 e 13 h. A avaliação dos reflexos foi realizada com base em modificações e adaptações de estudos anteriores^{31,32,36} (Tabela 1): recuperação do decúbito, aceleração, geotaxia negativa, aversão ao precipício, resposta ao susto e colocação pelas vibrissas. Para o dia de consolidação de cada reflexo, foi considerado o primeiro dia, em uma sequência de três dias consecutivos, a completa resposta reflexa esperada.

2.5 Análise estatística

Dados foram comparados pelo teste t de Student com nível de significância $P<.05$.

Tabela 1 - Procedimentos para detecção da maturação de reflexos

Reflexo	Estímulo	Resposta
Preensão palmar	A palma da pata é tocada levemente com um bastão metálico.	Flexão dos dedos. O dia que esse reflexo desaparece é o registro da maturação.
Recuperação do decúbito	O rato é colocado com o dorso sobre uma superfície plana	Ele se vira, retornando ao decúbito ventral, apoiado sobre as quatro patas, em 10 s
Colocação pelas vibrissas	O rato é suspenso pela cauda, a cabeça fica voltada para a borda de uma superfície plana, e apenas as vibrissas a tocam.	Levanta a cabeça e estende as patas dianteiras em direção à borda, tomando-se orientado a realizar movimento de andar, em 10 s.
Aversão ao precipício	Rato é colocado na borda da superfície plana com focinho e patas dianteiras tocando a borda.	Retirada da cabeça e das patas dianteiras, afastando-se da borda, em 10 s.
Resposta ao susto	Estímulo sonoro súbito de percussão com bastão metálico sobre superfície metálica.	Retração do corpo com mobilidade transitória. O estímulo é administrado duas vezes, em cada teste com intervalo de 1 min.
Geotaxia negativa	Rato é colocado de cabeça para baixo, em declive de 45°	Vira-se para enfrentar a inclinação, pelo menos, $\geq 130^\circ$, em 10 s.
Aceleração	Rato é suspenso pelas patas, ao ser abandonado de uma altura de 30 cm sobre uma cama de algodão.	Gira o corpo no ar ao ter as patas livres, e cai apoiado sobre as quatro patas.
De acordo com 31 e 32		

3 RESULTADOS

3.1 Desenvolvimento físico

O peso dos filhotes do grupo controle durante o período de lactação aumentou, consideravelmente, por volta de 758%, enquanto as medidas do corpo e do crânio aumentaram por volta de 200% (Figuras 1 e 2).

Os animais tratados com sertralina apresentaram padrão similar de desenvolvimento, mas mostraram evolução ponderal reduzida em relação às medidas do corpo e do crânio quando comparados com o grupo controle (Figuras 1 e 2). Um

significante desvio de 10% no ganho de peso corporal entre os grupos experimental e controle foi encontrado no 1º dia pós-natal (DPN) e alcançou 8,5% no 21º DPN (Figura 1A). O crescimento do eixo anteroposterior do corpo foi reduzido cerca de 6% no 1º DPN e assim permaneceu até o 21º DPN (Figura 1B). O tamanho do eixo anteroposterior do crânio foi reduzido em 3% no 1º DPN e assim permaneceu (Figura 2B). Entretanto, a largura do eixo laterolateral foi reduzida em 3,5% no 8º DPN e alcançando 2,5% de redução no final do experimento (Figura 2A).

As fêmeas do grupo Sert apresentaram redução no peso corporal ao longo do tratamento quando comparadas às do grupo Control (Figura 3).

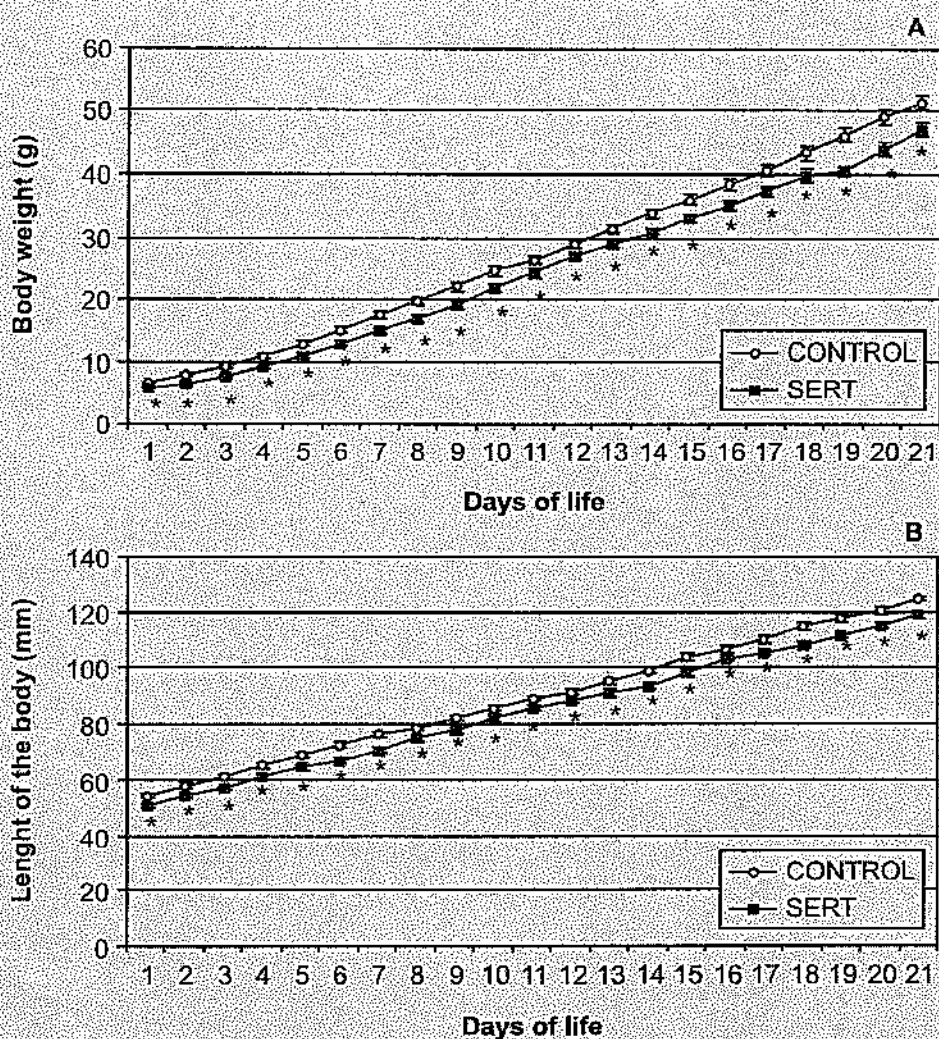


Figura 1 - Peso corporal (A) e eixo anteroposterior (longitudinal) do corpo (B) de neonatos no período de lactação do 1º ao 21º dia de vida; neonatos oriundos de mães tratadas com água destilada (n=18) ou sertralina (30 mg/Kg; n=18). (A) peso corporal (PC), (B) eixo anteroposterior (longitudinal) do corpo (EL). Dados apresentados em média \pm S.D.* P<.05. Student's t-test

Houve atraso na abertura do conduto auditivo e na irrupção dos incisivos inferiores dos animais do grupo experimental quando comparados ao grupo controle (Tabela 2).

3.2 Ontogênese de reflexos

O início de cada reflexo avaliado no grupo controle ocorreu em diferentes dias durante o período de lactação: houve atraso na maioria dos testes reflexos dos neonatos do grupo experimental quando comparados ao grupo controle (Tabela 3).

4 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos da administração diária de sertralina em ratas prenhes sobre o desenvolvimento somático e sensorio-motor dos filhotes durante o período de lactação. O tratamento com sertralina alterou o desenvolvimento somático e o sensorio-motor avaliados por danos nos parâmetros de maturação física e de reflexos nos neonatos. Em embriões, a 5-HT pode passar através da barreira placentária e da

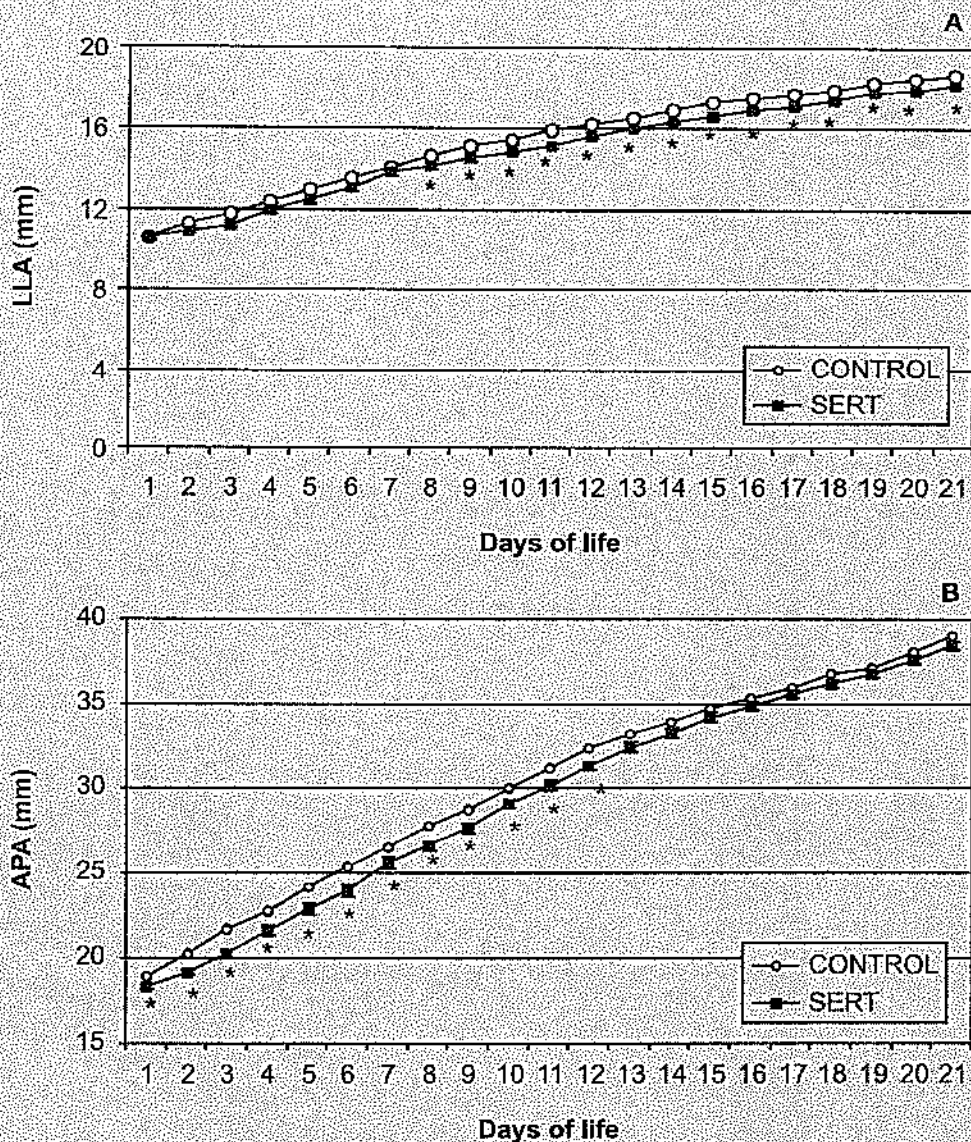


Figura 2 - Comprimento dos eixos do crânio de neonatos no período de lactação do 1º ao 21º dia de vida; neonatos oriundos de mães tratadas com água destilada (n=18) ou sertralina (30 mg/Kg, n=18). (A) Eixo laterolateral do crânio (ELLC), (B) eixo anteroposterior do crânio (EAPC). Dados apresentados em média \pm S.D. * P<05. Student's t-test

imatura barreira hematoencefálica³⁷. Além disso, sabe-se que a barreira placentária é a maior fonte de 5-HT embrionária³⁸. Durante a gestação, a barreira hematoencefálica não está bem estabelecida; desta maneira, drogas administradas matematicamente podem alcançar o feto relativamente em doses altas, e é possível que tal exposição à droga cause efeitos fisiológicos duradouros³⁹. Interações materno-infantis durante a lactação

podem modular o comportamento de crianças⁴⁰ e das mães⁴¹, influenciando o desenvolvimento fisiológico afetivo e a memória⁴².

Sertralina é o mais potente inibidor específico da recaptação da 5-HT no terminal pré-sináptico^{43,44}. Seu tempo de meia-vida ocorre cerca de 6 h após a administração em ratos 29,2 $\mu\text{mol/kg}$ ³⁴. Assim, a dose aqui administrada (87,5 $\mu\text{mol/kg}$) deve ter permitido um nível plasmático contínuo

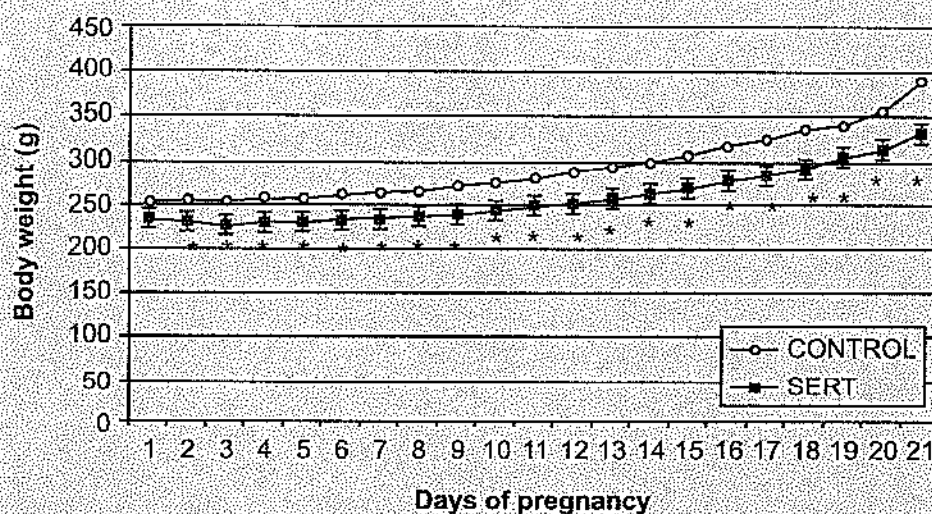


Figura 3 - Peso corporal de ratas fêmeas do 1º ao 21º dia de prenhez; ratas fêmeas foram tratadas com água destilada (n =7) ou sertralina (30 mg/Kg, n =9). Dados apresentados em média ± S.D. * P<.05. Student's t-test

Tabela 2 - Efeito da administração pré-natal de sertralina sobre as características físicas em ratos

Características físicas	Grupos		*p < .05
	Control	Sertralina	
	Média ± S.D.	Média ± S.D.	
Abertura do pavilhão auditivo	3.11 ± 0.9	3.06 ± 0.24	.802
Abertura do conduto auditivo	11.61 ± 0.5	12.44 ± 0.5 *	< .001
Irrupção dos incisivos superiores	8.22 ± 2.0	8.28 ± 0.8	.916
Irrupção dos incisivos inferiores	11.78 ± 1.0	12.56 ± 0.6 *	.008
Abertura dos olhos	13.50 ± 1.4	13.94 ± 0.9	.286

Tabela 3 - Efeito da administração pré-natal de sertralina sobre a ontogênese de reflexos em ratos

Reflexos	Grupos		*p < .05
	Control	Sertralina	
	Média ± S.D.	Média ± S.D.	
Preensão palmar	3.06 ± 1.1	3.72 ± 0.4 *	.03
Recuperação do decúbito	6.72 ± 1.0	8.11 ± 1.8 *	.008
Colocação pelas vibrissas	12.33 ± 0.4	15.67 ± 0.5 *	< .001
Aversão ao precipício	7.5 ± 0.8	8.61 ± 0.9 *	< .001
Geotaxia negativa	12.78 ± 1.5	17.11 ± 0.9 *	< .001
Resposta ao susto	12.06 ± 0.2	14.06 ± 0.8 *	< .001
Aceleração	12.00 ± 0.0	16.11 ± 0.7 *	< .001

e efetivo de sertralina por, no mínimo, quatro meia-vidas.

No presente estudo, filhotes de mães que receberam tratamento crônico com setralina apresentaram baixo peso do corpo ao nascimento, bem como tiveram atraso no ganho de peso corporal e no crescimento do eixo anteroposterior. Várias linhas de investigação sugerem que neurônios serotoninérgicos regulam o consumo alimentar em animais; a redução da neurotransmissão serotoninérgica por antagonistas de receptores da 5-HT⁴⁵ ou inibidores da síntese da 5-HT⁴⁶ produzem hiperfagia. Por outro lado, hipofagia é observada após o aumento da neurotransmissão serotoninérgica através da administração de 5-HT e seus precursores, agonistas dos receptores⁴⁷, liberador da 5-HT⁴⁸ e, ainda, de inibidores do metabolismo da 5-HT⁴⁹. A administração de tramadol, um analgésico opioide sintético que atua como agonista parcial e inibe recaptção de monoaminas, durante a gestação de ratas, causa perda de peso corporal da mãe e do feto⁵⁰. Além disso, a administração de ISRS como citalopram³² e sertralina³¹ causa um atraso dose-dependente na evolução do peso corporal e em padrões de crescimento, tais como eixo anterior-posterior do corpo e eixos do crânio. Tais alterações aqui observadas ocorreram provavelmente devido à redução da ingestão alimentar decorrente do tratamento como ISRS durante fases críticas para o desenvolvimento^{17,51}.

É importante considerar neste estudo o atraso no desenvolvimento das estruturas do crânio (abertura do conduto auditivo) e da face (incisivos inferiores), pois tais atrasos podem estar associados com a redução do crescimento do crânio. Por volta do 10^o dia embrionário, a 5-HT influencia ativamente o desenvolvimento craniofacial através da modulação das interações epitélio-mesenquimais que são essenciais para o desenvolvimento normal daquela área em ratos^{37,52,53}. Em culturas de camundongos, malformações cardíacas e craniofaciais produzidas pela exposição a inibidores da recaptção da 5-HT já foram demonstradas⁵⁴. Para suportar estes estudos pioneiros, mais recentemente, foi descoberto *in vivo* que o 5-HTT é transitoriamente expresso em várias células deri-

vadas da crista neural e em neurônios periféricos sensoriais durante o desenvolvimento^{55,56}.

Durante muito tempo, acreditou-se que a 5-HT regulava o desenvolvimento talamocortical⁵⁷. O sistema somatosensorial (SS) de roedores, que corresponde às vibrissas e o focinho do animal e sua representação somatotópica no núcleo trigeminal ("barrelete"), núcleo talâmico ventro-postero-medial ("barreloid") e córtex primário SS ("barrel")⁵⁸ tem sido particularmente útil para avaliar o papel da 5-HT no desenvolvimento talamocortical e na plasticidade. Evidências indiretas correlacionando a 5-HT ao desenvolvimento SS talamocortical foram inicialmente derivadas da distribuição transitória no córtex primário da 5-HT^{59,60} e dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2A}^{61,62} e do 5-HTT^{60,63} encontrados no córtex SS primário durante fases precoces pós-natais. Estudos anteriores em animais demonstraram a importância da MAO e 5-HTT para regular os níveis de 5-HT durante o desenvolvimento tanto em termos de formação como no comportamento. A monoamina oxidase tipo A (MAO-A) e tipo B (MAO-B) são flavoproteínas mitocondriais ligadas à membrana que participam da oxidação de uma ampla variedade de aminas biogênicas, como os neurotransmissores monoaminas, neurônios, glia e outros tipos celulares^{64,65}. A MAO-A é mais abundante em neurônios noradrenérgicos, e a MAO-B, em neurônios histaminérgicos e serotoninérgicos^{57,66-69}. Fisiologicamente, MAO-A e MAO-B também estão envolvidos na manutenção dos baixos níveis citosólicos e extracelulares de neurotransmissores monoaminérgicos e de vários substratos naturais que se acumulam no interior das células para atuarem como falsos neurotransmissores⁷⁰. Tais funções podem ser importantes, particularmente, durante o desenvolvimento. Além disso, o excesso de 5-HT transitória no cérebro durante estágios precoces do desenvolvimento pós-natal, como o detectado em camundongos sem MAO-A ou 5-HTT, foi descoberto e leva a alterações permanentes no córtex somatosensorial^{71,72}.

O papel trófico da 5-HT na formação das estruturas craniofaciais, incluindo o germe dentário, já foi descrito⁷³. Nossos achados em relação ao

atraso na irrupção dos incisivos inferiores do grupo sertralina são suportados por esses estudos. Ademais, existem evidências que ISRS e alguns agonistas serotoninérgicos aumentam a liberação de 5-HT em tecidos neurais (52) e não neurais⁷⁴.

O aparecimento ontogenético dos diferentes reflexos é caracterizado pela ocorrência de vários eventos do desenvolvimento no sistema nervoso central^{35,36}. Tais eventos, a adequada atividade estimulatória e formação de conexões, devem ocorrer de maneira orquestrada cronologicamente para permitir uma apropriada organização dos sistemas de neurotransmissores. As alterações podem modificar o início dos reflexos, o que indica atraso no desenvolvimento do sistema nervoso central. Durante o período pré-natal, a 5-HT exerce importante ação neurotrófica na diferenciação de várias estruturas envolvidas com a expressão de reflexos^{14,75}. O reflexo de preensão palmar é similar ao reflexo de Babinski em humanos; ambos avaliam a integridade da via piramidal⁷⁶. Assim, as diferenças observadas neste estudo sugerem um retardo motor precoce devido à exposição pré-natal à sertralina. Para o reflexo de geotaxia negativa, é importante observar a existência de três sistemas periféricos envolvidos na regulação e correção postural: o sistema vestibular e os sistemas exteroceptivo e proprioceptivo⁷⁷. Geotaxia negativa

neonatal geralmente reflete o grau de maturação do sistema vestibular⁷⁶. Nesta contribuição, o atraso na geotaxia sugere atraso no amadurecimento do sistema vestibular. Os efeitos sobre a maturação de reflexos sugerem que o aumento de 5-HT mediado por sertralina pode ter contribuído para as alterações estruturais e bioquímicas que afetam a ontogênese do sistema nervoso central.

Em resumo, a 5-HT desempenha importante papel no desenvolvimento das estruturas neurais, bem como sobre a função e o crescimento geral do corpo. No presente estudo, a administração de sertralina durante a gestação alterou o desenvolvimento morfológico e fisiológico dos neonatos; cuidados especiais devem ser tomados quando da manipulação do sistema serotoninérgico, principalmente durante fases altamente suscetíveis do desenvolvimento.

3 AGRADECIMENTOS

Este estudo recebeu apoio financeiro do CNPq (62.0136/2004-9 e 47.3535/2003-3) e CAPES/COFECUB (417-03). Os autores agradecem ao Sr. José Paulino e Edeones de França pela assistência técnica no NNI.

PRENATAL SERTRALINE EXPOSURE ALTERS NEONATAL SOMATIC AND SENSORIMOTOR DEVELOPMENT

Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) such as sertraline have been used to induce serotonergic activity in the brain. In this work, the prenatal effects of sertraline on the development and somatic growth of neonate rats were studied. Female Wistar rats were treated with sertraline (Sert, 30 mg/kg, 1 mL/100 g, s.c., n=9) or distilled water (Control, 1 mL/100 g, s.c., n=7) during the entire pregnancy. After birth, six neonate males were selected from each litter. They were divided in two groups (Sert or Control) according to the treatment their mothers received. A "blind" investigator evaluated indicators of general body growth parameters (body weight, anterior-posterior and latero-lateral axis of the head

ABSTRACT

ABSTRACT

and antero-posterior axis of the body) and physical features maturation (unfolding of the external ears and opening of the internal auditory conduit, eruption of upper and lower incisors and eye opening) during the period of lactation. Reflexes including palm grasping, righting, vibrissa placing, cliff avoidance, negative geotaxis, auditory startle response and free-fall righting were also evaluated. Findings indicate that chronic treatment with sertraline during the pregnancy of female rats impairs neonatal somatic and neuromotor development. This effect is associated with alterations in the serotonergic system during the early phases of development.

Keywords: Animals, Newborn, Rats, growth & development, Serotonin, Sertraline

1. Sundstrom E, Kolare S, Souverbie F, Samuelsson EB, Pschera H, Lunell NO, et al. Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993 Sep 17;75(1): 1-12.
2. Shen WZ, Luo ZB, Zheng DR, Yew DT. Immunohistochemical studies on the development of 5-HT (serotonin) neurons in the nuclei of the reticular formations of human fetuses. *Pediatr Neurosci.* 1989;15(6):291-5.
3. Kontur PJ, Leranath C, Redmond DEJR, Roth RH, Robbins RJ. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity and monoamine and metabolite levels in cryopreserved human fetal ventral mesencephalon. *Exp Neurol.* 1993 Jun;121(2):172-80.
4. Levallois C, Valence C, Balder P, Privat A. Morphological and morphometric analysis of serotonin containing neurons in primary dissociated cultures of human rhombencephalon: a study of development. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997 Apr 18;99(2):243-52.
5. Takahashi H, Nakashima S, Ohama E, Takeda S, Ikuta F. Distribution of serotonin-containing cell bodies in the brainstem of the human fetus determined with immunohistochemistry using antiserotonin serum. *Brain Dev.* 1986;8(4):55-6.
6. Colas JF, Launay JM, Vonesch JL, Hicckel P, Maroteaux L. Serotonin synchronises convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in *Drosophila*. *Mech Dev.* 1999 Sep;87(1-2):77-91.
7. Buznikov GA, Lambert HW, Lauder JM. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 2001 Aug;305(2):177-86.
8. Hedner J, Lundell KH, Breese GR, Mueller RA, Hedner T. Developmental variations in CFS monoamine metabolites during childhood. *Biol Neonate.* 1986;49(4):190-7.
9. Toth G, Fekete M. 5-hydroxyindole acetic excretion in newborns, infants and children. *Acta Paediatric Hung.* 1986;27(3):221-6.
10. Whitaker-Azmitia PM. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull.* 2001 Nov;56(5):479-85.
11. Verge D, Calas A. Serotonergic neurons and serotonin receptors: gains from cytochemical approaches. *J Chem Neuroanat.* 2000 Feb;18(1-2):41-56.
12. Gingrich JA, Hen R. Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice. *Psychopharmacol.* 2001 Apr;155(1):1-10.
13. Lauder JM, Luo X, Pérsico JM. Serotonergic regulation of somatosensory cortical development: lessons from genetic mouse models. *Dev Neurosci.* 2003 Mar-Aug;25(2-4):173-83.
14. Yan W, Wilson CC, Haring JH. 5-HT_{1a} receptors mediate the effects of 5-HT on developing dentate granule cells. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997 Feb 20;98(2):185-90.
15. Lauder JM, Wallace JA, Krebs H. Roles for serotonin in neuroembryogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 198;133:477-506.
16. Lauder JM, Liu J. Serotonin promotes region-specific glial influences on cultured serotonin and dopamine neurons. *Glia.* 1992;5(4):306-17.
17. Manhães-de-Castro R, Barreto Medeiros JM, Mendes da Silva C, Ferreira LMP, Guedes RCA, Cabral Filho JE. Reduction intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor. *Braz J Med Biol Res.* 2001 Jan;34(1):121-4.
18. Du L, Bakish D, Ravindran A, Hrdina PD. MAO-A gene polymorphisms are associated with major depression and sleep disturbance in males. *Neuroreport.* 2004 Sep 15;15(13):2097-101.
19. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, et al. Influence of life stress

- on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*. 2003 Jul 18;301(5631):386-9.
20. Borue X, Chen J, Condrón BG. Developmental effects of SSRIs: lessons learned from animal studies. *Int J Dev Neurosci*. 2007 Oct;25(6):341-7. Epub 2007 Jul 7.
21. Waldinger MD, Berendsen HHG, Blok BFM, Olivier B, Holstege G. Premature ejaculation and SSRI-induced delayed ejaculation: the involvement of the serotonergic system. *Behav Brain Res*. 1998 May;92(2):111-8.
22. Waldinger MD, Schweitzer DH, Olivier B. On-demand SSRI treatment of premature ejaculation: pharmacodynamic limitations for relevant ejaculation delay and consequent solutions. *J Sex Med*. 2005 Jan;2(1):121-31.
23. Blier P, De Montigny C. Possible serotonergic mechanisms underlying the antidepressant and antiobsessive-compulsive disorder responses. *Biol Psychiatry*. 1998 Sep 1;44(5):313-23.
24. Kroeze WK, Roth RL. The molecular biology of 5HT receptors: therapeutic implications for the interface of mood and psychosis. *Biol Psychiatry*. 1998 Dec 1;44(11):1128-42.
25. Holmes A, Murphy DL, Crawley JN. Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: parallels with human anxiety and depression. *Biol Psychiatry*. 2003 Nov 15;54(10):953-9.
26. Lira A, Zhou M, Castanon N, Ansorge MS, Gordon JA, Francis JH, et al. Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol Psychiatry*. 2003 Nov 15;54(10):960-71.
27. Hendrick V, Smith LM, Hwang S, Haynes D, Altshuler L. Weight gain in breastfed infants of mothers taking antidepressant medications. *J Clin Psychiatry*. 2003 Apr;64(4):410-2.
28. Weissman AM, Levy BT, Hartz AJ, Bentler S, Donohue M, Ellingrod VL, et al. Pooled analysis of antidepressant levels in lactating mothers, breast milk, and nursing infants. *Am J Psychiatry*. 2004 Jun;161(6):1066-78.
29. Nielsen JA, Chapin DS, Johnson JL, Torgersen LK. Sertraline, a serotonin-uptake inhibitor, reduces food intake and body weight in lean rats and genetically obese mice. *Am J Clin Nutr*. 1992 Jan;55(1 Suppl):185S-189S.
30. Halford JC, Blundell JE. Metergoline antagonizes fluoxetine-induced suppression of food intake but not changes in the behavioural satiety sequence. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996 Aug;54(4):745-51.
31. Deiró TCBJ, Manhaes-de-Castro R, Cabral-Filho JE, Barreto-Medeiros JM, Souza SL, Marinho SM, et al. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. *Physiol Behav*. 2006 Feb 28;87(2):338-44. Epub 2006 Jan 10.
32. Deiró TCBJ, Manhaes-de-Castro R, Cabral Filho JE, Souza SL, Freitas-Silva SR, Ferreira LMP, et al. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Oct;37(10):1503-9. Epub 2004 Sep 22.
33. Casper RC, Fleisher BE, Lee-Ancasas JC, Pilles A, Taylor E, De Batista A, et al. Follow-up of children of depressed mothers exposed or not exposed to antidepressant drugs during pregnancy. *J Pediatr*. 2003 Apr;142(4):402-8.
34. Hirano K, Kimura R, Sugimoto Y, Yamada J, Uchida S, Kato Y, et al. Relationship between brain serotonin transporter binding, plasma concentration and behavioral effect of selective serotonin reuptake inhibitors. *Br J Pharmacol*. 2005 Mar;144(5):695-702.
35. Fox MW. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. *Anim Behav*. 1965 Apr-Jul;13(2):234-41.
36. Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain. VI. Relative effects of fetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res*. 1971 Oct 29;33(2):303-14.
37. Shuey DL, Sadler TW, Tamir H, Lauder JM. Serotonin and morphogenesis: Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. *Anat Embryol*. 1993 Jan;187(1):75-85.
38. Vitalis T, Parnavelas JG. The role of serotonin in early cortical development. *Dev Neurosci*. 2003 Mar-Aug;25(2-4):245-56.
39. Almeida RG, Florio JC, Spinosa HS, Bernardi MM. Comparative effects of maternal prenatal and postnatal exposures to astemizole on reproductive parameters of rats. *Neurotoxicol Teratol*. 2002 Mar-Apr;24(2):255-65.
40. Wrate RM, Rooney AC, Thomas PF, Cox JL. Postnatal depression and child development. *Br J Psychiatry*. 1985 Jun;146:622-7.
41. Kinsley CH, Madonia L, Gifford GW, Tureski K, Griffen GR, Lowry C, et al. Motherhood improves learning and memory. *Nature*. 1999 Nov 11;402(6758):137-8.
42. Souza SL, Manhaes-de-Castro R, Nogueira MI. Comportamento alimentar neonatal. *Rev Bras Saude Mat Inf*. 2003 jul./set.;3(3):241-6.
43. Heym J, Koe BK. Pharmacology of sertraline: a review. *J Clin Psychiatry*. 1988 Aug;49 Suppl:40-5.
44. Murdoch D, McTavish D. Sertraline: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in depression and obsessive

- compulsive disorder. *Drugs*. 1992 Oct;44(4):604-24.
45. Atchley DPD, Eckel LA. Treatment with 8-OH-DPAT attenuates the weight loss associated with activity-based anorexia in female rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006 Apr;83(4):547-53. Epub 2006 Apr 27.
46. Hughes CR, Keele NB. Phenytoin normalizes exaggerated fear behavior in p-chlorophenylalanine (PCPA)-treated rats. *Epilepsy Behav*. 2006 Dec;9(4):557-63. Epub 2006 Oct 12.
47. Halford JC, Harrold JA, Boyland EJ, Lawton CL, Blundell JE. Serotonergic drugs: Effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Drugs*. 2007;67(1):27-55.
48. Lucas JJ, Yamamoto A, Scearce-Levie K, Saudou F, Hen R. Absence of fenfluramine-induced anorexia and reduced c-fos induction in the hypothalamus and central amygdaloid complex of serotonin 1B receptor knock-out mice. *J Neurosci*. 1998 Jul 15;18(14):5537-44.
49. Silberstein SD. Methysergide. *Cephalalgia*. 1998;18(7):421-35.
50. Santos AS, Azevedo EM, Oliveira-Filho RM, Simões MJ, Kulay Júnior L. Efeitos do uso crônico do tramadol sobre a prenhez da rata albina. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2001 mar.;23(2):113-7.
51. Souza SL, Nogueira MI, Jesus Deiró TC, Castro FM, Silva CM, Silva MC, et al. Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. *Physiol Behav*. 2004 Sep 15;82(2):375-9.
52. Lidov HGW, Molliver M.E. A immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Res Bull*. 1982 Apr;8(4):389-430.
53. Lauder JM, Tamir H, Sadler TW. Serotonin and morphogenesis: I. Sites of serotonin uptake and – binding protein immunoreactivity in the midgestation mouse embryo. *Development*. 1988 Apr;102(4):709-20.
54. Shuey DL, Sadler TW, Tamir H, Lauder JM. Serotonin as a regulator of morphogenesis: site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors. *Teratology*. 1992 Oct;46(4):367-78.
55. Hansson SR, Mezey E, Hoffman BI. Serotonin transporter messenger RNA in the developing rat brain: early expression in serotonergic neurons and transient expression in non-serotonergic neurons. *Neuroscience*. 1998 Apr;83(4):1185-201.
56. Lebrand C, Cases O, Wehrlé R, Blakely RD, Edwards RH, Gaspar P. Transient developmental expression of monoamine transporters in the rodent forebrain. *J Comp Neurol*. 1998 Nov 30;401(4):506-24.
57. Vitalis T, Fouquet C, Seif I, Price D, Gaspar P, Cases O. Developmental expression of monoamine oxidases A and B in the central nervous systems of the mouse. *J Comp Neurol*. 2002 Jan 21;442(4):331-47.
58. Woolsey TA, Van der Loos H. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res*. 1970 Jan 20;17(2):205-42.
59. Fujimiya M, Kimura H, Maeda T. Postnatal development of serotonin nerve fibers in the somatosensory cortex of mice studied by immunohistochemistry. *J Comp Neurol*. 1986 Apr 8;246(2):191-201.
60. D'Amato RJ, Blue ME, Largent BL, Lynch DR, Ledbetter DJ, Molliver ME, et al. Ontogeny of the serotonergic projection to rat neocortex: Transient expression of a dense innervation to primary sensory areas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987 Jun;84(12):4322-6.
61. Leslie MJ, Bennett-Clarke CA, Rhoades RW. Serotonin 1B receptors form a transient vibrissa-related pattern in the primary somatosensory cortex of the developing rat. *Brain Res Dev Brain Res*. 1992 Sep 18;69(1):143-8.
62. Bennett-Clarke CA, Leslie MJ, Chiaia NL, Rhoades RW. Serotonin 1 B receptors in the developing somatosensory and visual cortices are located on thalamocortical axons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Jan 1;90(1):153-7.
63. Fuchs JL. Neurotransmitter receptors in developing barrel cortex: Cerebral cortex. In: Jones EG, Diamond IT, editors. *The barrel cortex of rodents*. New York: Plenum Press; 1995. p. 375-409.
64. Weyler W, Hsu YP, Breakefield XO. Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. *Pharmacol Ther*. 1990;47(3):391-417.
65. Shih JC, Grimsby J, Chen K. Molecular biology of monoamine oxidase A and B: their role in the degradation of serotonin. In: Baumgarten HD, Gothert M, editors. *Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. Handbook of experimental pharmacology*. Berlin: Springer; 1997. p. 655-70.
66. Levitt P, Pintar JE, Breakefield XO. Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982 Oct;79(20):6385-9.
67. Lin JS, Fort P, Kitahama K, Panula P, Denney RM, Jouvét M. Immunohistochemical evidence for the presence of type B monoamine oxidase in histamine containing neurons in the posterior hypothalamus of cats. *Neurosci Lett*. 1991 Jul 8;128(1):61-5.
68. Lin JS, Kitahama K, Fort P, Panula P, Denney RM, Jouvét M. Histaminergic system in the cat hypothalamus with reference to

- type B monoamine oxidase. *J Comp Neurol.* 1993 Apr 15;330(3):405-20.
69. Luque JM, Kwan SW, Abell CW, Da Prada M, Richards JG. Cellular expression of mRNAs encoding monoamine oxidase A and B in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 1995 Dec 25;363(4):665-80.
70. Strolin-Benedetti M, Dostert P, Tipton KF. Developmental aspects of the monoamine-degrading enzyme monoamine oxidase. *Dev Pharmacol Ther.* 1992;18(3-4):191-200.
71. Cases O, Vitalis T, Seif I, De Maeyer E, Sotelo C, Gaspar P. Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron* 1996 Feb;16(2):297-307.
72. Persico AM, Mengual E, Moessner R, Hall SF, Revay RS, Sora I, et al. Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamocortical afferents, and not vesicular monoamine release. *J Neurosci.* 2001 Sep 1;21(17):6862-73.
73. Moiseiwitsch JRD, Lauder JM. Stimulation of murine tooth development in organotypic culture by the neurotransmitter serotonin. *Arch Oral Biol.* 1996 Feb;41(2):161-5.
74. Lauder JM, Zimmerman EF. Sites of serotonin uptake in epithelia of the developing mouse palate, oral cavity and face: possible role in morphogenesis. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1988;8(3):265-76.
75. Lauder JM. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci.* 1993 Jun;16(6):233-40. Review.
76. Bolles RC, Woods PJ. The ontogeny of behaviour in the albino rat. *Anim Behav.* 1964;12:427-41.
77. Altman J, Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav.* 1975 Nov;23(4):896-920.

DEDALUS - Acervo - IP



12300057626