

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ENVOLVIMENTO DOS NÚCLEOS DA ESTRIA TERMINAL E AMÍGDALA NA
MODULAÇÃO DE REFLEXOS NEUROENDÓCRINOS E COMPORTAMENTO
MATERNAL EM RATAS

SIMONE MEDEIROS

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Santa Catarina, para obtenção
do grau de Mestre em Neurociências

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mariana Graciela Terenzi

FLORIANÓPOLIS, 2004

RISCOS

"Rir é correr o risco de parecer tolo.

Chorar é correr o risco de parecer sentimental.

Estender a mão é correr o risco de se envolver.

Expor seus sentimentos é correr o risco de mostrar seu verdadeiro eu.

Defender seus sonhos e idéias diante da multidão é correr o risco de perder pessoas.

Amar é correr o risco de não ser correspondido.

Viver é correr o risco de morrer.

Confiar é correr o risco de fracassar.

Mas os riscos devem ser corridos, porque o maior perigo é não arriscar nada. A pessoa que não corre nenhum risco não faz nada, não tem nada e não é nada.

Elas podem até evitar sofrimentos e decepções, mas elas não conseguem nada, não sentem, não mudam, não crescem, não amam, não vivem.

Acorrentadas por suas atitudes, elas viram escravas, privam-se de sua liberdade. Somente a pessoa que corre risco é livre" (Leo Buscaglia)

Sou livre... Simone

Agradecimentos:

Pai e mãe, muito obrigada pelo amor, pela vida, pelo apoio constante, pela compreensão e a confiança que vocês depositam em mim;

Professora Mariana, obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela compreensão, pelo exemplo profissional, pela amizade;

Elô e Carol, obrigada pela força que vocês me deram no laboratório e pela amizade;

Sô, minha querida irmãzinha, valeu pela alegria e apoio nas horas que precisei...;

Lenir, Renata, Patrícia Brocardo, Simone Maidel, Patrícia Batista ... valeu!!!!

Prof^a Yara, obrigada pela constante atenção e apoio nos momentos que precisei;

Nivaldo, secretário da Neuro, obrigada pela sua constante disposição em nos atender e em solucionar nossos casos;

Obrigada a TODOS os professores da Neuro e funcionários da Fisiologia, que sempre trabalham em prol da nossa formação;

Agradeço a Deus e aos ensinamentos da seicho-no-ie que me deram forças e serenidade para que tudo ocorresse da melhor forma possível.

MUITO OBRIGADA!!!!!!!!!!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	
Parto, Lactação e Comportamento Maternal	11
Modulação de reflexos neuroendócrinos e comportamentos maternos em ratas pelo estresse	14
Papel dos opióides e oxitocina nos reflexos neuroendócrinos e no comportamento materno de ratas	15
O Cérebro Materno	19
OBJETIVOS	26
MATERIAIS E MÉTODOS	
Animais	28
Drogas	28
Cirurgia Estereotáxica	29
Microinjeção	30
Experimento 1	30
Experimento 2	
Experimento 2.1	32
Experimento 2.2	33
Experimento 3	
Experimento 3.1	36
Experimento 3.2	36
Análise Histológica	37
Análise Estatística	38
RESULTADOS	
Experimento 1	41
Experimento 2	
Experimento 2.1	48
Experimento 2.2	56
Experimento 3	
Experimento 3.1	73
Experimento 3.2	81
DISCUSSÃO	
Efeito da microinjeção de agonistas opióides nos núcleos da estria terminal (NET) no progresso do parto	92

Efeito da microinjeção de antagonistas opióides nos núcleos da estria terminal (NET) em ratas parturientes e lactantes submetidas a estresse	94
Efeito da microinjeção de agonista GABA _a na amígdala em ratas parturientes e lactantes submetidas a estresse	98
CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

ENVOLVIMENTO DOS NÚCLEOS DA ESTRIA TERMINAL E AMÍGDALA NA MODULAÇÃO DE REFLEXOS NEUROENDÓCRINOS E COMPORTAMENTO MATERNAL EM RATAS

Medeiros, Simone

Departamento de Fisiologia, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina

A ocitocina (OT) é um neurohormônio hipotalâmico, com receptores no sistema límbico. Sua secreção pode ser inibida por opióides e estresse. Os núcleos da estria terminal (NET) modulam a secreção de OT em reflexos neuroendócrinos relacionados com o comportamento maternal (CM) e são ricos em receptores opióides. Em situação de estresse, opióides endógenos podem agir sobre os NET inibindo o CM. O uso de antagonista opióide nesta área poderia anular o efeito do estresse sobre o CM. A amígdala, uma região ativada em situação de estresse, possui vias encefalinérgicas inibitórias que se projetam para os NET. Esta inibição dos NET poderia causar um prejuízo no CM. A microinjeção de agonista GABA_a na amígdala poderia inibir estas vias. Neste projeto investigamos o envolvimento dos NET e da amígdala na modulação de reflexos neuroendócrinos no CM. Ratas Wistar prenhas foram submetidas a cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia nos NET (experimento 1 e 2) ou na amígdala (exp. 3). As parturientes foram divididas nos grupos: C, DAGO, U-50488 (exp. 1); C, CE, N, NE (exp. 2.1); C, CE, M, ME (exp. 3.1). Os controles (C e CE) receberam microinjeção de salina, os experimentais receberam agonista opióide (DAGO ou U-50488); antagonista opióide (naltrexona, grupos N e NE) ou agonista GABA_a (muscimol, grupos M e ME). No dia do parto, as ratas foram microinjetadas após o nascimento do 1º filhote (exp. 1) ou do 3º filhote (exp. 2.1 e 3.1). Nos grupos CE, NE e ME logo após a microinjeção a rata foi transferida juntamente com seus filhotes para uma caixa isoladora colocada dentro de outra onde havia um rato macho, permanecendo nesta situação por 30 min, quando então retornava filhotes à caixa de origem. Os intervalos entre os nascimentos foram cronometrados. Vinte e quatro horas após o parto, os filhotes foram distribuídos pela caixa e o CM observado por 2 períodos de 30 min (1ª e 2ª etapa). Exp 1: O uso de agonista no NET não teve efeito no progresso do parto, porém 24 h depois o grupo U-50488 passou menos tempo em atividades maternas na 1ª etapa de observação. Exp. 2.1 e 3.1: O estresse não interferiu no progresso do parto. O tratamento com naltrexona ou com muscimol não alterou o progresso do parto nem o CM 24 pós-parto. Ratas lactantes foram separadas de seus filhotes por 20 horas no 7º dia após parto, no dia seguinte os filhotes eram induzidos a liberar urina e fezes e então pesados. Cinco minutos antes do teste as lactantes recebiam os seguintes tratamentos: exp. 2.2, salina para os grupos controle (C e CE), naltrexona (grupos N e NE), nor-binaltorfimina (grupos B e BE) ou naloxonazina (grupos NZ e NZE); exp. 3.2, salina para os grupos controle (C e CE) e muscimol (grupos M e ME). Após a microinjeção, as ratas dos grupos CE, NE, BE e NZE foram reunidas a oito filhotes distribuídos em uma caixa limpa onde havia um rato macho isolado dentro de uma caixa, durante as 2 etapas de observação do CM; os grupos C, N, B e NZ foram manipulados apenas para a microinjeção e então retornaram juntamente com 8 filhotes distribuídos uniformemente à caixa de origem e o CM foi observado durante 2 etapas. Exp. 2.2: A situação de estresse durante o período de lactação não interferiu no CM. Entretanto, a nor-binaltorfimina fez com que ratas estressadas permanecessem menos tempo em atividades não maternas. Exp. 3.2: O estresse prejudicou a recuperação dos filhotes, entretanto, diminuiu a latência para o início da amamentação, o tempo de construção do ninho, o tempo não maternal e o tempo total. Em ratas estressadas o tratamento com muscimol não foi benéfico, a recuperação dos filhotes foi mais demorada para o grupo ME. A neurotransmissão dos NET parece não ter influência na modulação dos reflexos neuroendócrinos que ocorrem durante o parto. Entretanto, os receptores κ deste núcleo parecem estar envolvidos com o estabelecimento do CM 24 h após o parto. O estresse sócio-ambiental não interferiu no progresso do parto das ratas nem no CM 24 h após o parto. Naltrexona nos NET ou muscimol na amígdala no momento do parto não interferiu no progresso do parto ou na expressão do CM 24 h após o parto. Distúrbios sócio-ambientais no período de lactação alteraram o CM das ratas. Antagonismo dos receptores κ nos NET pode auxiliar na prevenção parcial dos efeitos do estresse em ratas lactantes. No período de lactação, o muscimol microinjetado na amígdala prejudicou o CM das ratas estressadas.

MODULATORY ROLE OF THE BED NUCLEI OF THE STRIA TERMINALIS AND AMYGDALOID COMPLEX IN NEUROENDOCRINE REFLEXES AND MATERNAL BEHAVIOUR IN THE RAT

Medeiros, Simone

Department of Physiology, CCB, Federal University of Santa Catarina

Oxytocin (OT) is a hypothalamic neurohormone with receptors in the limbic system. OT secretion is inhibited by opioids and stress. The bed nuclei of the stria terminalis (BNST) modulate OT secretion during neuroendocrine reflexes related to maternal behaviour (MB). The BNST is rich in opioid receptors (μ and κ). Exposure to stressful events could induce the release of endogenous opioids into the BNST and inhibit MB. Opioid antagonists microinjected into the BNST could therefore prevent the stress induced deficits in MB and OT secretion. The amygdala is a region that mediates the effects of stress on several behaviours, and has strong inhibitory enkephalinergic projections to the BNST. It is suggested that the amygdala could participate in the modulation of MB. The aim of this study was to investigate the role of the BNST and the Amygdala in the expression of MB in female rats.

Female Wistar rats (250 g) were submitted to stereotaxic surgery one week before parturition. Guide cannulae were implanted into the BNST (experiments 1 and 2) or the amygdala (exp 3). On the day of parturition, the animals were divided into groups C (n=5), D (n=7) and U (n=5) (experiment 1); C (n=7), CE (n=7), N (n=6) and NE (n=7) (exp 2); C (n=9), CE (n=7), M (n=8) and ME (n=8) (exp 3). Control groups (C and CE) were microinjected with 0.5 μ L saline. Experimental groups received (always 0.5 μ L volume) 0.5 μ g DAGO (μ agonist, D), 0.5 μ g U50488 (κ agonist, U), 10 μ g naltrexone (N and NE) or 2 μ g muscimol (GABA A agonist, M and ME). All drugs were given to the parturient immediately after the birth of the first (exp 1) or third pup (exp 2 and 3). Groups CE, NE and ME were exposed for 30 min to a male rat separated by a wall. At the end of the 30 min, the female rat was returned to her home cage with any newborn pups. Interbirth intervals were registered. Twenty-four hours after delivery, MB was analysed for 2x30 min (phases 1 and 2). None of the opioid agonists used had any measurable effect on the progress of parturition, however, 24 h later, group U spent less time in MB during the 1st phase (C: 15.9 \pm 3.4; U: 7.5 \pm 4.7 min). Also, stress (CE) or naltrexone did not interfere with normal parturition.

Rats implanted with cannulae into the BNST (2.2) or the amygdala (exp 3.2) were separated from their pups for 20 h on the 7th day of lactation. On the following day, the pups were cleaned and weighed and the dams were microinjected with saline (C n=8, CE n=8) or an opioid antagonist (exp 2.2): 10 μ g naltrexone (N n=8, NE n=7), 4 μ g nor-binaltorphimine (κ antagonist, B n=8, BE n=6) or 10 μ g naloxonazine (μ 1 antagonist, NZ n=8, NZE n=8). For exp 3.2 the drug tested was 2 μ g muscimol (M n=7, ME n=8) and the control C (n=8) and CE (n=7). Five min after the microinjection all the animals of the stressed groups were exposed for the duration of the observation period to a male rat separated by a wall. MB was analysed. Exp 2.2) Stress during lactation did not interfere with MB. B treated animals spent less time in non-maternal behaviours. Exp 3.2) Stressed lactating rats took longer to retrieve the pups, spent less time nest building and in non-MB. On the other hand, stress decreased the onset to initiate lactation and improved the length of nursing. Muscimol retarded pup retrieval even further (CE: 15.2 \pm 5.7; ME: 26.0 \pm 3.8 min).

In conclusion, the BNST does not appear to modulate the neuroendocrine events that control parturition. However, activation of κ opioid receptors in this area could disrupt MB 24 h post-partum. Stress did not interfere with parturition or MB 24 h later. Inhibition of the amygdala by muscimol during parturition improved MB 24 h later. In lactating rats, stress modified the behaviour of the dam towards her litter. Kappa opioid receptor antagonism of BNST neurones could prevent some of the deleterious effects of stress on MB during lactation. Inhibition of the amygdala by muscimol was, contrary to expectation, detrimental to MB in lactating rats.

INTRODUÇÃO

Parto, Lactação e Comportamento Maternal

O parto é um processo durante o qual o feto, a placenta e as membranas fetais são expelidos do trato reprodutor; o trabalho de parto é a seqüência de contrações uterinas, involuntárias que levam à dilatação da cérvix e à saída do feto e placenta do útero (Moore e Persaud, 2000). Este fenômeno depende essencialmente das contrações uterinas, que têm por finalidade dilatar o istmo e o colo uterino, promover a descida e a expulsão do feto e determinar a expulsão da placenta (Antunes-Rodrigues e Favaretto, 1999). Segundo Santos (2002), em ratas Wistar, o parto tem duração média de 1 a 2 horas, com uma média de 8 filhotes/parto, mas podendo ser de até 16 filhotes. Vários hormônios estão relacionados com o início das contrações uterinas; a ocitocina, hormônio sintetizado nos núcleos hipotalâmicos (núcleos paraventricular e supra-óptico), é fundamental para a manutenção das contrações uterinas (Antunes-Rodrigues e Favaretto, 1999). Segundo Ganong (1989), no início do trabalho de parto há um aumento de receptores de ocitocina no endométrio e no miométrio que resulta em uma maior responsividade do útero. A ocitocina age diretamente sobre as células musculares lisas do útero fazendo-as contrair; também estimula a liberação de prostaglandinas pela decídua, que estimulam a contratilidade do miométrio, sensibilizando as suas células para a ocitocina (Moore e Persaud, 2000). A participação do estradiol também é sugerida por Moore e Persaud (2000), segundo eles o estradiol aumenta a atividade contrátil do miométrio e estimula a liberação de ocitocina e de prostaglandinas.

Segundo Antunes-Rodrigues e Favaretto (1999), o mecanismo de desencadeamento do início das contrações uterinas ainda não está de todo determinado, ele varia de acordo com a duração do período gestacional do animal, entretanto, um fator conhecido e que é fundamental para o início das contrações é o equilíbrio entre os esteróides gonadais (estradiol e progesterona), uma queda nos níveis de progesterona determina a elevação relativa do estradiol e conseqüentemente, da excitabilidade uterina. Em ratas, onde o período gestacional é de 19-22 dias (Santos, 2002), este equilíbrio entre os esteróides também reflete na manutenção do período gestacional, uma vez que esta é mediada pelo sistema hipotálamo-hipófise-gonadal (Antunes-Rodrigues e Favaretto, 1999).

Desta forma, a gestação e o parto implicam em mudanças hormonais que têm efeito no período de lactação que sucede o parto. Com a expulsão da placenta, caem os níveis plasmáticos dos esteróides gonadais diminuindo a ação inibidora sobre a hipófise (que ocorre durante a gestação), promovendo o aumento da secreção de prolactina (hormônio hipofisário que atua diretamente sobre as células da glândula mamária) e a estimulação da secreção láctea (Antunes-Rodrigues e Favaretto, 1999). Segundo Tucker (1994), o início da lactação (lactogênese) requer um mínimo de mudança hormonal que envolve a secreção de prolactina, glucocorticóide e estradiol. Entretanto, a ejeção do leite (um reflexo neuroendócrino) depende da sucção do mamilo; através da estimulação dos receptores do mamilo o hipotálamo ativa os mecanismos de liberação da prolactina e ocitocina, que promoverão a secreção láctea e a contração mioepitelial respectivamente e desta forma a ejeção de leite ocorrerá (Antunes-Rodrigues e Favaretto, 1999).

Segundo Pough et al (1993), nos mamíferos a mãe possui um papel relevante em relação à prole e que são precisamente definidos e absolutamente essenciais para o sucesso reprodutivo; uma fêmea de mamífero deve apresentar ajustes fisiológicos e

comportamentais precisos para que seu investimento na prole não seja em vão. A amamentação, os cuidados com os filhotes, a preparação do ninho dentre outros são comportamentos apresentados por fêmeas de mamíferos no período de gestação e lactação classificados na categoria dos comportamentos maternos. Segundo Brown (1998), o comportamento maternal em ratas já ocorre antes do nascimento e são preparados pelas mudanças hormonais que ocorrem durante a gestação. Ratas gestantes lambem e cuidam de seus mamilos e genitais facilitando a função secretora e o crescimento mamário, como também já iniciam a construção do ninho horas antes do parto. Durante o parto, a fêmea lambe os filhotes à medida que eles nascem, limpando-os dos fluídos e estimulando-os. No período de lactação, a fêmea reúne os filhotes no ninho e agacha-se sobre eles em postura de amamentação, facilitando o acesso dos filhotes ao ninho; também faz a manutenção do ninho, comportamento que existe até o momento em que os filhotes ficam ativos e abandonam o ninho; o recolhimento dos filhotes (quando estes ainda dependentes da mãe deixam o ninho) é um das respostas mais utilizadas como medida do comportamento maternal (Brown, 1998).

Sendo assim, a expressão do comportamento maternal durante o período de gestação até o final do período de lactação, requer esta série de alterações endócrinas e comportamentais da fêmea. Porém, há alguns fatores extrínsecos que fazem com que a fêmea apresente comportamentos diferentes e inadequados para este período.

Modulação de reflexos neuroendócrinos e comportamentais maternos em ratas pelo estresse

Estresse é um fenômeno biológico que tem respostas coordenadas compostas por alterações no comportamento, nas funções autonômicas e na secreção endócrina (Carrasco e Kar, 2003).

O estresse pode ser proveniente de diferentes situações. O meio, a situação e os elementos no qual o animal vive refletem em seu estado comportamental e endócrino. Ambientes não familiares ao animal e distúrbios ambientais fazem com que haja uma maior atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA); em ratas prenhas resulta na depressão da secreção de ocitocina e na interrupção do parto (Leng e Russel, 1989). O estresse ambiental aumenta a duração do parto por induzir a liberação de opióides endógenos, esse efeito é bloqueado pela administração sistêmica de naloxona (antagonista opióide) (Leng et al, 1988). Conflitos sociais, como a introdução de um intruso no meio, ou a instabilidade social (por exemplo, superpopulação), aumentam a atividade da adrenal (glândula que libera a corticosterona, hormônio liberado pela adrenal dos ratos em situação de estresse) em ratos (Haller et al, 1998). Em ratas lactantes, o conflito social ativa o eixo HPA (Neumann et al, 2001). Em camundongas gestantes, o estresse pré-parto torna a fêmea mais agressiva aos intrusos no ninho (Pardon et al, 2000). No período de gestação (Russell et al, 2001) e de lactação (Mezzacappa et al, 2003) há uma atenuação nas respostas ao estresse; a atividade do eixo HPA é diminuída no período de gestação (Russell et al, 2001) e esta inibição está associada com a ação inibitória dos opióides endógenos (Wigger et al, 1999).

Papel dos opióides e ocitocina nos reflexos neuroendócrinos e no comportamento maternal de ratas

Os opióides são neurotransmissores que fazem parte de um dos sistemas peptídicos mais estudados do Sistema Nervoso Central (SNC). O termo opiáceo refere-se a drogas semelhantes estruturalmente à morfina, substância derivada do ópio (obtido da *Papaver somniferum*, conhecida popularmente como papoula do oriente). No cérebro de ratas, opióides endógenos são sintetizados em algumas áreas como: hipotálamo, amígdala, área pré-óptica medial, septo, tálamo (McLean et al, 1986).

Opióides e opiáceos agem por ligar-se a receptores específicos. Os receptores opióides têm sido alvo de intensos estudos, desde a sua descoberta em 1973 (Mansour et al, 1995). Três tipos principais de receptores opióides foram identificados: κ , μ e δ ; e estes estão amplamente distribuídos no SNC e periférico (Mansour et al, 1988; Lesscher et al, 2003).

Segundo Mansour et al (1988), em ratos, os receptores μ estão amplamente distribuídos e são detectados em maior densidade no núcleo accumbens, caudado-putamen, na maioria dos núcleos talâmicos, núcleos da estria terminal, colículos superior e inferior, hipocampo, núcleo trigeminal e corno dorsal da medula espinhal; uma densidade moderada é observada na substância cinzenta periaquedutal e núcleos da rafe, e uma baixa densidade é encontrada no hipotálamo, área pré-óptica e globo pálido. A distribuição dos receptores opióides μ está intimamente relacionada com o seu papel na regulação da dor e integração sensoriomotora. Os receptores κ estão localizados no caudado-putamen, núcleo accumbens, núcleos da estria terminal, amígdala, hipotálamo, neurohipófise, eminência mediana e

núcleo do trato solitário; são encontrados também na substância cinzenta periaquedutal, núcleos da rafe e corno dorsal da medula. Agonistas κ estão relacionados com a regulação do balanço hídrico (provavelmente inibindo a secreção de vasopressina), percepção da dor e funcionamento neuroendócrino. Os receptores δ distribuem-se nas áreas neurais olfatórias, neocórtex, caudado-putâmen, núcleo accumbens e amígdala. Agonistas δ exercem papel na integração motora, olfação e cognição. Na formação hipocampal há abundância de receptores μ , enquanto que receptores κ e δ estão em menor quantidade. Já o diencéfalo e o telencéfalo apresentam predominância de receptores μ e κ (Mansour e cols., 1988).

Em determinadas situações a densidade de receptores opióides nos sítios de atuação, sofre algumas alterações. No período de gestação, em ratas, é observada uma maior densidade de receptores μ no hipotálamo, que se torna mais elevada ao final da gestação, mas após o parto (6-8 dias) a densidade destes receptores retorna aos valores normais independentemente da mãe estar amamentando ou não (Dondi et al, 1991). A área pré-óptica medial também possui uma alta densidade de receptores μ durante a gestação, que é reduzida no período de lactação (Hammer et al, 1992).

Segundo Leng e Russell (1989), os opióides têm uma grande influência sobre o sistema neural magnocelular, pois agem sobre a secreção do terminal nervoso na neurohipófise e sobre a atividade elétrica do corpo celular no hipotálamo, resultando na inibição da secreção de ocitocina.

A ocitocina é um hormônio secretado na neurohipófise pelos neurônios magnocelulares dos núcleos paraventricular (PVN) e supra-óptico (SON) do hipotálamo, e tem um importante papel no momento do parto (Fuchs et al, 1995) e na expressão do comportamento maternal (Pedersen et al, 1992).

No parto espontâneo, pulsos de potenciais de ação ocorrem nos neurônios magnocelulares do PVN e do SON, havendo um aumento significativo dos níveis plasmáticos de ocitocina (Russell et al, 1989). No período pós-parto, o sistema ocitocinérgico também é ativado, há um aumento da síntese de ocitocina nos neurônios magnocelulares hipotalâmicos e liberação na neurohipófise e regiões límbicas (Insel e Shapiro, 1992; Neumann et al, 1993). Pulsos de potenciais também ocorrem nas células secretoras de ocitocina durante a ejeção de leite. Os pulsos de secreção de ocitocina são consequência da estimulação somatossensorial do reflexo de sucção dos filhotes que ativa neurônios ocitocinérgicos da mãe localizados no PVN e SON do hipotálamo (Wakerley et al, 1994). Os sítios de atuação da ocitocina, em ratas, são praticamente todas as áreas envolvidas com a modulação do comportamento maternal (Pedersen et al 1992) como: área pré-óptica medial, amígdala, núcleos da estria terminal, núcleos paraventricular e supra-óptico do hipotálamo, núcleo olfatório posterior, área ventral do hipocampo, septo lateral.

Há uma oscilação na densidade dos receptores de ocitocina em determinados momentos. Estudos autoradiográficos mostram que em ratas lactantes há um aumento de receptores ocitocina nos núcleos da estria terminal (NET) e no núcleo ventromedial do hipotálamo 24h pós-parto; nos NET este aumento (84%) já tem início no período da gestação e permanece até pelos menos o 6º dia de lactação (Insel e Shapiro, 1992). Champagne et al (2001) sugerem que as diferenças nos níveis de receptores de ocitocina estejam relacionadas com o comportamento maternal; ratas que apresentam maiores respostas maternas e também maior cuidado com os filhotes apresentam um aumento significativo de receptores de ocitocina na área pré-óptica medial, no septo lateral, no núcleo central da amígdala, nos NET e no núcleo paraventricular do hipotálamo. Também já foi sugerido que as diferenças individuais no comportamento maternal de ratas podem

estar associadas com a variação da expressão dos receptores de ocitocina (Francis et al, 2000).

A atividade dos neurônios ocitocinérgicos é influenciada por esteróides ovarianos, especificamente pelo estradiol (Jirikowski et al, 1989). O tratamento com estradiol em ratas virgens aumenta a densidade de receptores ocitocinérgicos na área pré-óptica medial e no septo lateral (Champagne et al, 2001). Logo toda a mudança hormonal que há no período de peri-parto (período que compreende os dias que antecedem o parto, o dia do parto e os primeiros dias pós-parto) estaria alterando a secreção de ocitocina. O estradiol também pode estar atuando sobre o tônus opióide. Durante o período de gestação e no parto é observado um aumento do tônus opióide no hipotálamo, amígdala e mesencéfalo, que é diminuído no período pós-parto, sugerindo que o estradiol atue na estimulação da liberação opióide (Wardlaw e Frantz ,1983). Porém, esta variação do tônus opióide irá interferir na atividade dos neurônios ocitocinérgicos; durante a gestação os opióides inibem os terminais ocitocinérgicos, mas ao final da gestação há uma dessensibilização da ação opióide sobre a hipófise, reduzindo o poder desta ação inibitória e permitindo um aumento da liberação de ocitocina (Russell et al, 1995).

Em outras regiões límbicas que participam da facilitação do reflexo da ejeção de leite induzido por ocitocina, como os NET e o septo ventrolateral, também é observado um aumento no tônus opióide que impede a secreção de ocitocina, ratas anestesiadas no dia 22 de gestação mostraram ter maior atividade neural nos NET e no septo ventrolateral quando tratadas com naloxona (antagonista opióide) (Housham et al, 1995). O tratamento com morfina (subcutaneamente) entre os dias 11 e 18 da gestação em ratas, causa uma diminuição do comportamento maternal no período de lactação, as ratas cuidam menos tempo dos filhotes e permanecem pouco tempo no ninho (Slamberová et al, 2001). O uso

de morfina (i.c.v.) em ratas lactantes, gera uma profunda inibição da liberação de ocitocina, fazendo com que a ejeção do leite seja diminuída (Leng e Russel, 1989).

A ação central da ocitocina como neurotransmissor no final da gestação é necessária para que haja a secreção hormonal (ocitocina pela neurohipófise) adequada no momento da amamentação e o ganho de peso dos filhotes, pois o tratamento (i.c.v.) no final da gestação com antagonista ocitocinérgico causa uma redução no peso dos filhotes e um atraso na liberação de ocitocina induzida por sucção (Lipschitz et al, 2003).

O Cérebro Materno

O período peri-parto é caracterizado por alterações endócrinas, neuro-fisiológicas e comportamentais da mãe, necessárias para a manutenção e o desenvolvimento do feto. E também para preparar a fêmea, de forma que esta apresente um comportamento maternal adequado (Brown, 1998). Segundo Russell (2001), as mudanças adaptativas que ocorrem no cérebro da parturiente, assim como a secreção de hormônios específicos da gestação (gonadotrofina coriônica, lactogênio placentário e relaxina), seriam causadas pela grande secreção de hormônios ovarianos (estradiol e progesterona) e hipofisários (prolactina). Em ratas, a partir do 8º dia de gestação, em áreas cerebrais envolvidas com o comportamento maternal (amígdala, hipotálamo, mesencéfalo) há um aumento de opióides endógenos (Wardlaw e Frantz, 1983), que provavelmente afeta na secreção de ocitocina.

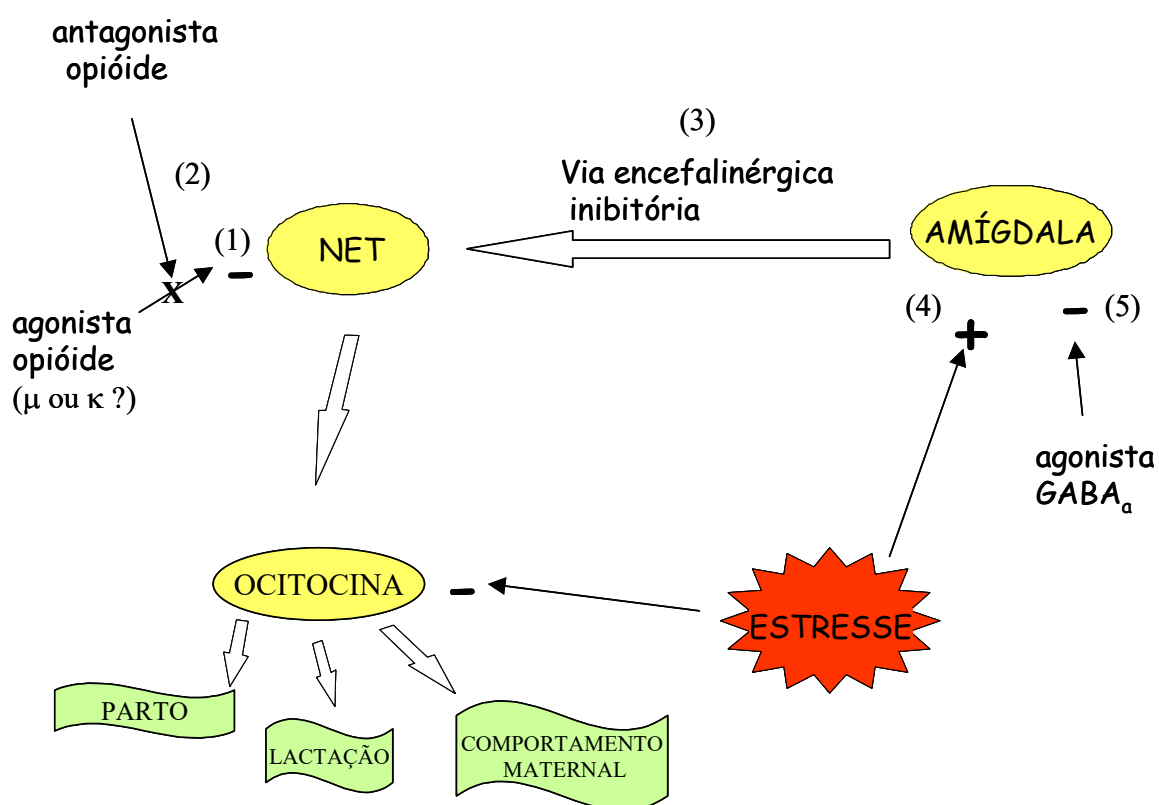
Segundo Russell et al (2001), no período de lactação ocorrem adaptações fisiológicas na lactante que dependem da interação mãe-filhote; a hiporesponsividade da lactante à situações de estresse neste período é eliminada pela presença dos filhotes, a rata

mostra-se mais agressiva ao intruso (macho) e tem maiores respostas neuroendócrinas (ACTH e corticosterona) (Deschamps et al, 2003). A separação da mãe e dos filhotes por 15 minutos, logo após o nascimento destes, não interfere no comportamento maternal no período de lactação, as ratas têm comportamento normal (recolhem os filhotes, permanecem no ninho e adotam postura de amamentação) 7 dias pós-parto, mostrando que a expressão do comportamento maternal é dependente do convívio com os filhotes (Byrnes et al, 2002). Segundo Brown (1998), a exposição diária de filhotes a ratas virgens faz com que estas sofram alterações hormonais subjacentes ao comportamento maternal e que expressem comportamento semelhante à rata lactante.

Estas alterações na rata durante o período de peri-parto estão intimamente relacionadas ao sistema límbico. Áreas cerebrais que modulam variados tipos de comportamento, também atuam sobre o comportamento maternal. A área pré-óptica medial é uma das áreas cerebrais, envolvidas com a modulação do comportamento maternal. Stack et al (2002) afirmam que esta área é essencial para o desenvolvimento do comportamento maternal normal em ratas; lesões nesta área acarretam no rompimento do comportamento maternal. O tratamento com morfina subcutaneamente em ratas lactantes prejudica o início do comportamento maternal e causa uma menor atividade c-Fos na área pré-óptica medial (Stafisso-Sandoz et al, 1998). A substância cinzenta periaquedutal (PAG) é apontada como outra área envolvida com a expressão do comportamento maternal; o pré-tratamento em ratas com morfina (s.c) por 5 dias (a partir do 17º dia de gestação) e uma nova administração de morfina no dia 6 pós-parto (30 minutos antes do teste de comportamento maternal) inibe o comportamento maternal nos 30 minutos iniciais do teste (60 minutos); o pré-tratamento com morfina (s.c) apresenta um aumento significativo da expressão Fos na PAG lateral mostrando um certo recrutamento da PAG lateral na inibição do

comportamento maternal (Miranda-Paiva et al, 2003). A amígdala também entra no grupo de áreas cerebrais envolvidas com a expressão do comportamento maternal, estimulações elétricas na amígdala medial acarretam na inibição do surgimento do comportamento maternal; ratas que tiveram esta área estimulada eletricamente apresentaram uma maior latência para o surgimento do comportamento maternal (Morgan et al, 1999); lesões na amígdala medial ou nos núcleos anterior e ventro-medial do hipotálamo facilitam a expressão o comportamento maternal, ratas gestantes expostas a “filhotes-estímulos” que tiveram a amígdala medial e os núcleos anterior e ventro-medial do hipotálamo lesionados bilateralmente, apresentaram um maior percentual em atividades maternas que as ratas gestantes não lesionadas (Sheehan et al, 2001). Os núcleos da estria terminal (NET), que são um complexo de corpos celulares e fibras com uma variedade de neurotransmissores e neuromoduladores, incluindo dopamina, noradrenalina, adrenalina, acetilcolina e encefalinas (Casada e Dafny, 1993), têm sido descritos como responsáveis pela modulação de alguns reflexos neuroendócrinos associados ao comportamento maternal (Ingram et al, 1995, Terenzi et al, 1995). Os NET apresentam uma alta sensibilidade a opióides (Matsui e Yamamoto, 1984) e são ricos em receptores opióides (Mansour et al, 1988). Dalsass e Siegel (1990) encontraram que a microiontoforese de agonistas opióides nos NET provoca inibição da atividade espontânea de seus neurônios. Os NET são potencialmente importantes para a regulação de respostas comportamentais ao estresse e sua habilidade para modular componentes da resposta ao estresse sugere que a modificação comportamental causada pelo estresse pode ser reproduzida por drogas que alterem a excitabilidade de seus neurônios (como os opióides) (Casada e Dafny, 1993). Os NET recebem projeções de diversas origens (Ju et al, 1989). Vias encefalinérgicas inibitórias originadas no núcleo central da amígdala para os NET já foram descritas por Uhl et al

(1978), Sawada e Yamamoto (1981) e Rao et al (1987). A amígdala, que é uma das áreas cerebrais ativadas em situação estresse, poderia ser um caminho para a transferência da informação do estímulo estressante para o resto do sistema límbico (Hilton e Zbrozyna, 1963; Gray, 1993). Mas suas respostas perante situação estressora variam de acordo com o tipo de estresse, o grau de ativação da liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH, hormônio que modula no cérebro as respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse) induzida por estresse irá depender do tipo da situação estressora que agirá sobre a amígdala (Hand et al, 2002). A neurotransmissão GABAérgica na amígdala é importante para a aquisição e expressão de medo condicionado e na modulação da memória e na ansiedade (Jasnow e Huhman, 2001). O GABA é um neurotransmissor inibitório no cérebro e tem dois tipos de receptores: GABA_a e GABA_b (Rang et al, 1996). A infusão de agonista GABA_a (muscimol) na amígdala bloqueia a aquisição e a expressão de medo condicionado (Helmstetter e Bellgowan, 1994) e produz efeitos ansiolíticos no teste de labirinto em cruz elevada e no teste de conflito social (Sanders e Shekhar, 1995). A infusão



de muscimol na amígdala pode bloquear a aquisição e a expressão de derrota condicionada, o que indica que a neurotransmissão GABAérgica na amígdala está envolvida com a aquisição e expressão de medo ou de mudanças comportamentais induzidas pelo estresse (Jasnow e Huhman, 2001).

Em conclusão, os NET descritos como moduladores da secreção de ocitocina e do comportamento maternal, podem participar dos eventos que ocorrem durante o parto e também em outras alterações fisiológicas que ocorrem com a fêmea no período de lactação (ver diagrama acima). Opióides inibem estes eventos; efeito que poderia ser mimetizado com o uso de agonistas opióides (1) e revertido por antagonistas opióides (2). Por possuir conexão com os NET (3), fazer parte do sistema límbico e ser ativada em situações de estresse (4), a amígdala pode ser um centro mediador destes reflexos neuroendócrinos modulados pelos NET, que podem estar sendo inibidos em situação de estresse. O uso de agonista GABA_a na amígdala (5) poderia prevenir esta inibição dos NET uma vez que as vias encefalinérgicas da amígdala para os NET não estariam sendo excitadas.

OBJETIVOS

Experimento 1:

- 1.1) Determinar o efeito da microinjeção de agonistas opióides (DAGO ou U-50488) nos núcleos da estria terminal no progresso do parto e comportamento maternal 24 h pós-parto em ratas.

Experimento 2:

- 2.1) Determinar o efeito da microinjeção de antagonista opióide (naltrexona) nos núcleos da estria terminal no progresso do parto e comportamento maternal 24 h pós-parto, em ratas submetidas ou não a estresse ambiental;
- 2.2) Determinar o efeito da microinjeção de antagonistas opióide (naltrexona, norbinaltorfimina e naloxonazina) nos núcleos da estria terminal no comportamento maternal em ratas lactantes submetidas ou não a estresse ambiental.

Experimento 3:

- 3.1) Determinar o efeito da microinjeção de agonista GABA_a (muscimol) na amígdala, no progresso do parto e comportamento maternal 24 h pós-parto, em ratas submetidas ou não a estresse ambiental;
- 3.2) Determinar o efeito da microinjeção de agonista GABA_a (muscimol) na amígdala, no comportamento maternal em ratas lactantes submetidas ou não a estresse ambiental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas 228 ratos Wistar (143 fêmeas e 85 machos, sendo que 21 fêmeas foram observadas 2 vezes: durante o parto e também na lactação). Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC (projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFSC nº 23080.001092/2001-97). As ratas de 80 a 90 dias de idade (200g) foram acasaladas no biotério do Departamento de Fisiologia. O acasalamento foi realizado pela coabitação de uma fêmea com um macho (70-90 dias, 250-300 g) por um período de 4 dias e 3 noites. Todas as fêmeas utilizadas eram primíparas (1ª gestação).

Os animais tiveram acesso livre à comida e água, exceto durante as observações. Permaneceram em ambiente climatizado (24° C) e com ciclo de luminosidade claro-escuro de 12 h, com luzes acesas às 7 horas.

Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- DAGO: agonista opióide μ (Sigma; ZHANG e KELLEY, 1997)
- (-)-U-50488 hidrocloreto: agonista opióide κ (Tocris; ZHANG e KELLEY, 1997)
- naltrexona hidrocloreto: antagonista opióide (Sigma; BRODNAR et al, 1995)
- nor-binaltorfimina diidrocloreto: antagonista opióide κ (Tocris; BRODNAR et al, 1995)
- naloxonazina: antagonista opióide μ_1 (Tocris; KELLEY et al, 1996)
- muscimol: agonista GABA_a (Tocris; SPANIS et al, 1999)

Cirurgia Estereotáxica

Na segunda semana após o acasalamento, aproximadamente cinco dias antes do parto, as ratas foram anestesiadas com 10 mg/Kg (intra-muscular) de cloridrato de xilazina (Virbaxyl 2%, Virbac), como pré-anestésico e 35 mg/Kg (intra-peritonial) de Tiopental sódico (Thionembutal, Abbott). As ratas foram fixadas em aparelho estereotáxico (Insight Equipamentos). Uma incisão elíptica (1 cm x 1,5 cm) da pele, camada muscular e periósteo, foi realizada expondo a calota craniana. A seguir, com uma broca de 1 mm de diâmetro, o crânio foi perfurado em dois pontos para a colocação de miniparafusos de níquel/prata (218) como ponto de fixação do implante. Em seguida, o ponto de inserção da cânula-guia foi marcado:

- Para os núcleos da estria terminal foram utilizadas as coordenadas: 0 mm posterior ao bregma, 1 mm à direita da linha média e 4,5 mm abaixo da calota craniana (Paxinos e Watson, 1998). Esse ponto fica 2 mm dorsal ao núcleo da estria terminal. Foi utilizada uma cânula-guia de 12 mm (G25) e o implante foi coberto com acrílico autopolimerizante (Policron).
- Para a amígdala as coordenadas foram: 2 mm posterior ao bregma, 3,6 mm à direita e à esquerda da linha média (implante bilateral) e 6,5 mm abaixo da calota craniana (Paxinos e Watson, 1998). Esse ponto fica 2 mm dorsal à amígdala. Foi utilizada uma cânula-guia de 14 mm (G25) e o implante foi coberto com acrílico autopolimerizante (Policron).

Microinjeção

A rata foi contida em uma toalha. A microinjeção foi realizada com uma agulha 30 G (agulha de 12 mm nos experimentos 1 e 2; agulha de 14 mm no experimento 3) acoplada a uma cânula de polietileno (PE10) e esta a uma seringa (Hamilton) de 5 μ L. O volume microinjetado foi de 0,5 μ l dispensado em um período de 2 minutos.

Experimento 1

Efeito da microinjeção de agonistas opióides nos núcleos da estria terminal no progresso do parto

O início do parto foi determinado pelo nascimento do primeiro filhote em todos os grupos experimentais. Após o nascimento deste, as parturientes receberam a microinjeção com os seguintes tratamentos:

Grupo	Tratamento	n
Salina	salina 0,5 μ l de NaCl (0,9%)	5
DAGO	DAGO (0,5 μ g/0,5 μ l)	7
U-50488	(-)U-50488 (0,5 μ g/0,5 μ l)	5

Nos 3 grupos, foi monitorado o momento a regularidade dos intervalos entre nascimentos de cada filhote pós-tratamento e a duração total do parto.

Vinte e quatro horas pós-parto, o número de filhotes foi contado, as eventuais mortes registradas e a ninhada espalhada pela caixa. Os seguintes parâmetros foram registrados durante uma hora dividida em dois períodos de 30 minutos:

- Recuperação dos filhotes: latência (minutos) para a rata pegar o filhote com a boca e transportá-lo para o provável ninho, a partir do momento em que foi posta em contato com os filhotes, ou seja, logo após o momento em que foi colocada na caixa de observação, onde estavam os filhotes distribuídos uniformemente.
- Latência para o início da amamentação: tempo (minutos) para o início da amamentação desde a união da rata aos filhotes na caixa de observação. O início da amamentação foi definido como o momento em que pelo menos 4 filhotes estavam presos aos mamilos da rata.
- Tempo em postura de amamentação: tempo (minutos) despendido pela rata amamentando ou em postura de amamentação.
- Tempo maternal: tempo (minutos) despendido pela rata mostrando comportamento maternal direto (limpando ou transportando os filhotes) ou indireto (construindo, melhorando ou mudando de local o ninho) porém, não em postura de amamentação.
- Tempo não maternal: tempo (minutos) despendido pela rata em comportamentos não maternais (auto-limpeza, exploração da gaiola, etc...).

Todos estes parâmetros, exceto a recuperação dos filhotes e a latência para o início da amamentação, foram registrados em uma segunda etapa de 30 minutos, sem a manipulação dos animais.

Experimento 2

2.1) Efeito da microinjeção de antagonista opióide não seletivo nos núcleos da estria terminal no progresso do parto

No dia do parto, os animais foram designados para receber os seguintes tratamentos:

Grupo	Condições do parto	Tratamento	n
C	não estresse	salina 0,5µl de NaCl (0,9%)	7
CE	estresse sócio-ambiental	salina 0,5µl de NaCl (0,9%)	7
N	não estresse	naltrexona (10µg/0,5µl)	6
NE	estresse sócio-ambiental	naltrexona (10µg/0,5µl)	7

O início do parto foi determinado pelo nascimento do primeiro filhote em todos os grupos experimentais. Após o nascimento do terceiro filhote, os grupos CE e NE foram transferidos, juntamente com os filhotes recém-nascidos, a uma caixa isoladora (20 x 10 x 15 cm), com 5 aberturas (1 x 1 cm), colocada dentro de uma caixa normalmente usada como gaiola (30 x 40 x 15 cm), na qual se encontrava um macho, esta situação caracterizou o estresse sócio-ambiental na fêmea parturiente, porém, com o mínimo contato somato-sensorial entre o macho e a fêmea (adaptado de Leng et al, 1988 e Haller et al, 1998). As ratas permaneceram nesta situação por 30 min após o qual retornaram às respectivas caixas de origem. Os grupos C e N foram manipulados, também após o nascimento do terceiro filhote, porém, apenas para a microinjeção e logo após retornaram às suas caixas.

Em todos os grupos, foram monitorados a regularidade dos intervalos entre os nascimentos de cada filhote e a duração do parto.

Vinte e quatro horas pós-parto, foram registrados os mesmos parâmetros da observação 24 horas pós-parto realizada no experimento 1.

2.2) Efeito da microinjeção de antagonistas opióides nos núcleos da estria terminal no comportamento maternal e lactação

Sete a oito dias pós-parto, os filhotes foram separados da rata e colocados em um recipiente (14 x 7 x 14 cm) que continha folhas de papel toalha e um pouco de serragem, por um período de 20 horas antes da observação comportamental. Pouco antes do início da observação, os filhotes foram induzidos a eliminar urina e fezes através de massagem na região do períneo, e foram pesados.

Cinco minutos antes do início da observação foi realizada a microinjeção nas ratas de acordo com a tabela abaixo:

Grupo	Condições	Tratamento	n
C	não estresse	salina 0,5 µl de NaCl (0,9%)	8
CE	estresse sócio-ambiental	salina 0,5 µl de NaCl (0,9%)	8
N	não estresse	naltrexona (10µg/0,5µl)	8
NE	estresse sócio-ambiental	naltrexona (10µg/0,5µl)	7
B	não estresse	nor-binaltorfimina (4µg/0,5µl)	8
BE	estresse sócio-ambiental	nor-binaltorfimina (4µg/0,5µl)	6
NZ	não estresse	naloxonazina (10µg/0,5µl)	8
NZE	estresse sócio-ambiental	naloxonazina (10µg/0,5µl)	8

Após a microinjeção, as ratas dos grupos CE, NE, BE e NZE foram reunidas a oito filhotes distribuídos uniformemente em uma caixa limpa onde havia um rato macho dentro de uma caixa isoladora, com 5 aberturas. Esta situação caracterizou estresse sócio-ambiental na fêmea lactante, porém com o mínimo de contato somato-sensorial entre o macho e a fêmea. Esta situação permaneceu durante as 2 etapas de observação, a fim de verificar as diferentes alterações do comportamento maternal ao longo do tempo.

Os grupos C, N, B e NZ foram manipulados apenas para a microinjeção e então retornaram juntamente com 8 filhotes distribuídos uniformemente à caixa de origem.

Então foram registrados os seguintes parâmetros do comportamento maternal:

- Recuperação dos filhotes (idem experimento 1)
- Latência para o início da amamentação (idem experimento 1, porém em ambas as etapas)
- Modo de início da amamentação (forma pela qual a amamentação foi iniciada); para este item, foi utilizada a seguinte escala de classificação (escores):

4: iniciada pela rata (lactante se posicionava sobre os filhotes no ninho e permanecia em posição arqueada, típica postura de amamentação)

3: iniciada pelos filhotes, com ajuda da rata (filhotes aproximavam-se da mãe e esta se posicionava sobre os filhotes em postura de amamentação limpando-os e pegando-os com a boca)

2: iniciada pelos filhotes, sem ajuda da rata (filhotes aproximavam-se da mãe)

1: iniciada pelos filhotes, com rejeição materna (filhotes dirigiam-se ao encontro da mãe, porém ela rejeitava-os saindo do local onde estava ou afastando-os com o focinho para longe dela)

0: não ocorria a amamentação (a rata não se colocava em postura de amamentação, não se aproximava dos filhotes, ficava em um local onde não havia filhotes e os filhotes não iam ao encontro da rata)

- Número de filhotes no ninho a cada 5 minutos do período de 30 minutos iniciais de observação por cada etapa.
- Tempo de construção do ninho: tempo (minutos) que a rata apresentou atividade de manipulação de material para a construção de ninho, recolhendo material (maravalha) com a boca e levando-o até o local do ninho ou melhorando o ninho ajeitando-o com o focinho.
- Tempo maternal (idem experimento 1)
- Tempo não maternal (idem experimento 1)
- Tempo total: tempo (minutos) despendido pela rata para completar 15 minutos de amamentação.

Este tempo de 15 min foi estipulado como o mínimo suficiente para induzir reflexo de ejeção de leite em ratas lactantes não anestesiadas (ver Wakerley et al, 1994). Os filhotes foram pesados ao final deste período.

Todos os parâmetros, exceto a recuperação dos filhotes, foram novamente registrados em uma segunda etapa de 15 minutos de amamentação. Nesta segunda etapa, os filhotes foram colocados no ninho novamente ou nos casos onde não havia um local de ninho pré-definido, os filhotes foram postos onde a rata permaneceu por mais tempo na etapa anterior. O ganho de peso (em porcentagem) dos filhotes foi registrado ao final de cada etapa.

Experimento 3

3.1) Efeito da microinjeção bilateral de agonista GABA_a na amígdala no progresso do parto

No dia do parto, os animais foram designados para receber os seguintes tratamentos:

Grupo	Condições do parto	Tratamento	n
C	não estresse	salina 0,5µl de NaCl (0,9%)	9
CE	estresse sócio-ambiental	salina 0,5µl de NaCl (0,9%)	7
M	não estresse	muscimol (2 µg/0,5 µl)	8
ME	estresse sócio-ambiental	muscimol (2 µg/0,5 µl)	8

O início do parto e os registros realizados foram semelhantes aos utilizados no experimento 2.1.

3.2) Efeito da microinjeção bilateral de agonista GABA_a na amígdala no comportamento maternal e lactação

Foram utilizados parâmetros semelhantes ao experimento 2.2, porém com o seguinte tratamento:

Grupo	Condições do teste	Tratamento	n
C	não estresse	salina 0,5µl de NaCl (0,9%)	8
CE	estresse sócio-ambiental	salina 0,5µl de NaCl (0,9%)	7
M	não estresse	muscimol (2 µg/0,5 µl)	7
ME	estresse sócio-ambiental	muscimol (2 µg/0,5 µl)	8

Os parâmetros registrados foram os mesmos do experimento 2.2.

Análise Histológica

Um dia após o fim dos experimentos, as ratas foram mortas por injeção de Tiopental sódico (50 mg/Kg i.p.). A seguir foi microinjetado 0,5 µL de solução 0,3% de Azul de Evans pela cânula guia e então se realizou a perfusão com solução de formalina (10% de formaldeído em 0,9 de salina) injetada por via transcardíaca. Os cérebros foram retirados e conservados em formalina 10 % por 5-7 dias. Um dia antes da histologia o cérebro foi crio-preservedo em sacarose (30%). O seccionamento foi realizado em micrótomo de congelamento (LEICA CM1325). Secções de 30 µm foram montadas em lâminas gelatinizadas e secas ao ar.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico para verificar o local de injeção (posição da mancha de Azul de Evans). Somente animais microinjetados nas regiões mostradas no diagrama (ver página 39) tiveram seus resultados analisados. Os cortes coronais mostram os locais de microinjeção dos animais incluídos neste trabalho.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através da aplicação de teste paramétrico de ANOVA de 2 vias com repetição para avaliar as possíveis diferenças no progresso do parto, na média dos nascimentos em 30 min, recuperação dos filhotes e ganho de peso dos filhotes, variáveis que tiveram distribuição normal; quando adequado foi utilizado o teste de Duncan como post-hoc.

Para as variáveis com distribuição não normal (latência para início da amamentação, tempo de amamentação, tempo maternal, tempo não maternal, tempo de construção do ninho, tempo total, modo de início da amamentação e número de filhotes no ninho) foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney (post hoc).

Todos os resultados foram expressos em média±erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para valores de $p \leq 0,05$; foram também mostrados os resultados que tiveram valores de p entre 0,06 e 0,08.

Os valores de F (obtido através de teste paramétrico) e de H (obtido através de teste não paramétrico) foram inclusos nos resultados quando necessários.

RESULTADOS

Experimento 1

Efeito da microinjeção de agonistas opióides nos núcleos da estria terminal (NET) no progresso do parto

O número de filhotes na ninhada variou entre 10 e 14 para o grupo salina, 9 e 13 para o grupo DAGO e 10 e 13 para o grupo U-50488. Como o número mínimo de filhotes por ninhada foi de 9 e a microinjeção nos NET ocorreu logo após o nascimento do 1º filhote (ocasionalmente a microinjeção nos NET ocorreu após o nascimento do 2º filhote), a análise do progresso do parto foi limitada a 8 filhotes. Da mesma forma procedeu-se à análise do recolhimento 24 h após o parto.

- Progresso do parto (figura 1):

Após a microinjeção de salina nos NET (grupo salina), o 1º filhote demorou $20,0 \pm 5,0$ min para nascer; a duração total do parto (até o nascimento do 8º filhote, último analisado) foi de $62,4 \pm 11,1$ min.

O progresso do parto nos grupos tratados com DAGO ou U-50488 não apresentou diferença estatística quando comparados ao do grupo salina ($F_{(2,13)} = 0,63$; $p = 0,55$).

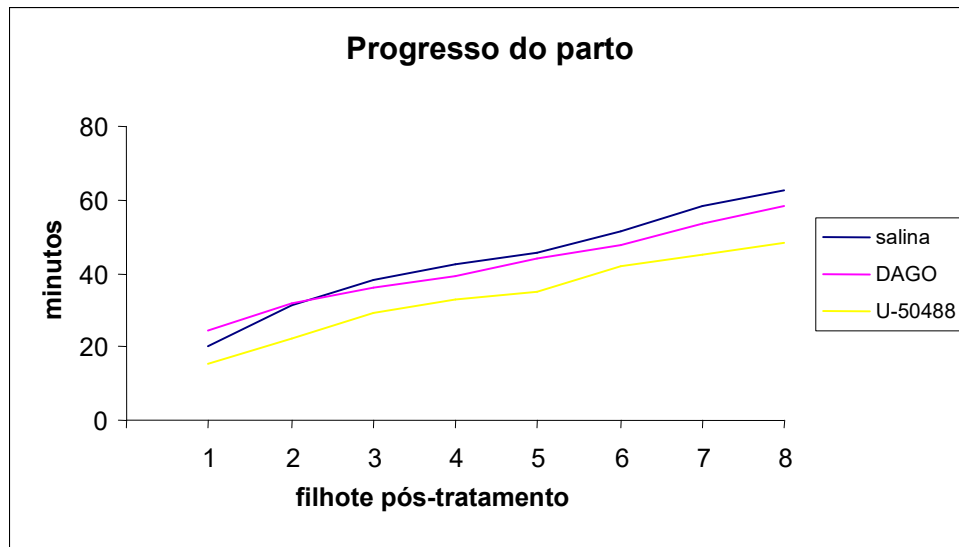


Figura 1: Progresso do parto (média) em ratas tratadas com salina ou com agonistas opióides (DAGO ou U-50488) nos NET após o nascimento do 1º filhote. ($F_{(2,13)} = 0,63$; $p = 0,55$)

- Número de filhotes nascidos 30 minutos após o tratamento (figura 2):

O grupo salina teve uma média de $2 \pm 0,9$ filhotes nascidos neste período de observação, o grupo DAGO teve uma média de $2,3 \pm 0,6$ filhotes e o grupo U-50488 $4,6 \pm 1,5$ filhotes, onde observou-se que o tratamento com agonista opióide não causou nenhum efeito significativo sobre o número de filhotes nascidos 30 minutos após a microinjeção ($F_{(2,14)} = 2,44$; $p = 0,12$).

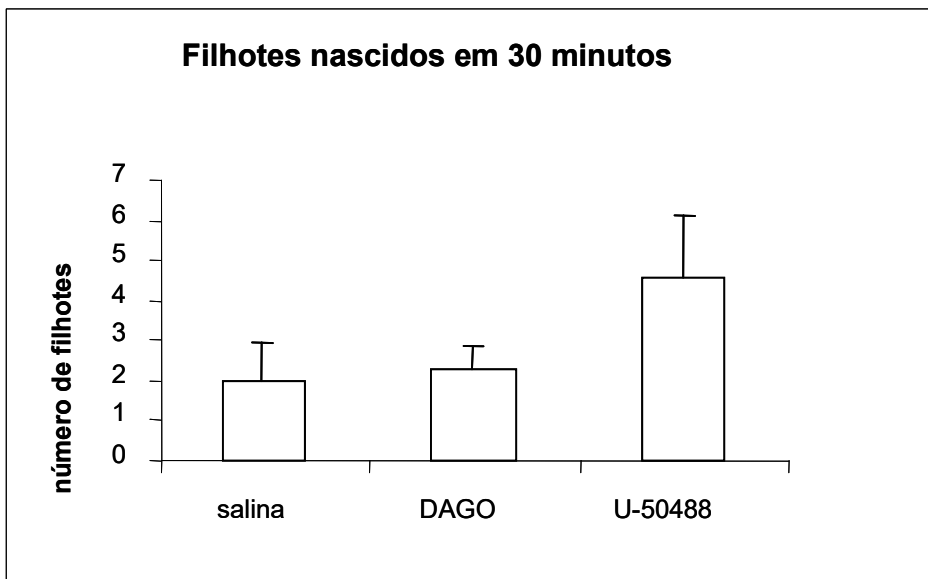


Figura 2: Número de filhotes nascidos 30 minutos após o tratamento (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção (após o nascimento do 1º filhote) de salina ou de agonista opióide (DAGO e U-50488) nos NET durante o parto. ($F_{(2,14)} = 2,44$; $p = 0,12$)

- Recuperação dos filhotes 24 h pós-parto (figura 3):

As ratas do grupo salina recuperaram o 1º filhote $0,4 \pm 0,4$ min logo após o início da observação e demoraram $5,4 \pm 3,4$ min para recuperar o 8º filhote (último analisado).

A microinjeção com agonista opióide no momento do parto não interferiu na recuperação dos filhotes 24 h após o parto ($F_{(2,11)} = 0,57$; $p = 0,58$).

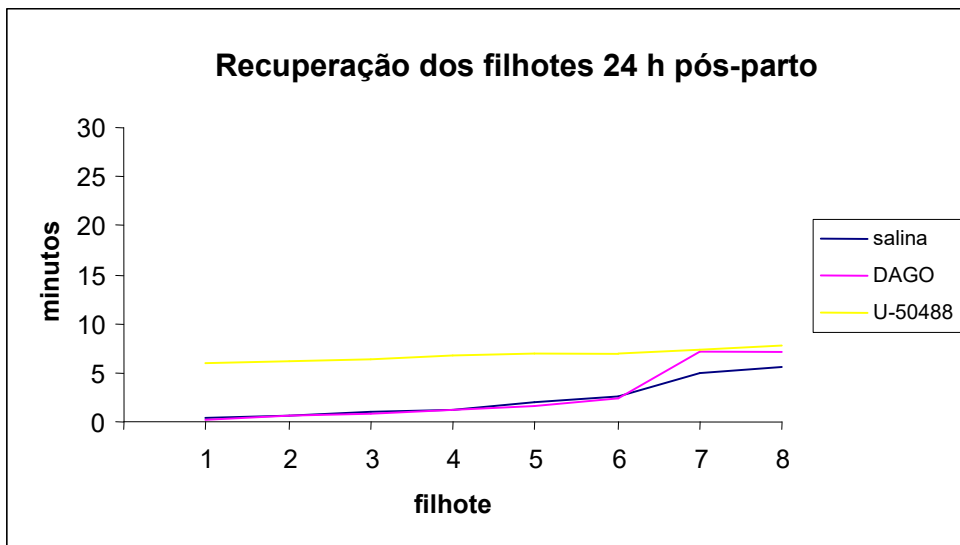


Figura 3: Recuperação dos filhotes 24 h pós-parto (média). Efeito da microinjeção de salina ou de agonista opióide (DAGO e U-50488) nos NET durante o parto (após o nascimento do 1º filhote). ($F_{(2,11)} = 0,57$; $p = 0,58$)

- Latência para o início da amamentação 24 h pós-parto (figura 4):

A latência para o início da amamentação 24 h pós-parto nos animais tratados com salina logo após o nascimento do 1º filhote foi de $13,8 \pm 3,9$ min.

Não foi observada diferença estatística entre o grupo salina e os demais grupos, todavia o grupo DAGO foi mais ágil (Mann-Whitney: $p = 0,01$) para iniciar a amamentação ($5,7 \pm 1,5$ min) quando comparado ao grupo U-50488 ($15,6 \pm 4,4$ min) ($H_{(2,16)} = 7,4$; $p = 0,02$).

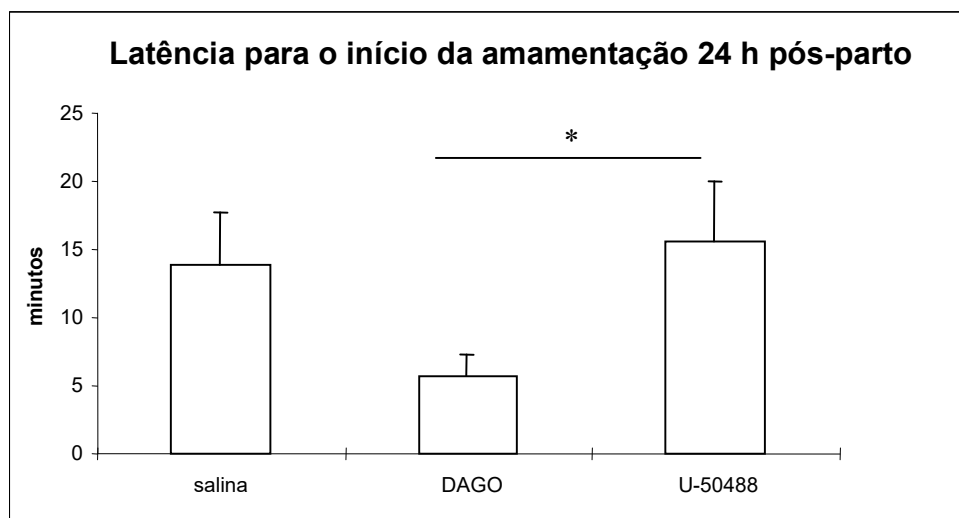


Figura 4: Latência para o início da amamentação 24 h pós-parto (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou de agonista opióide (DAGO e U-50488) nos NET, após o nascimento do 1º filhote. ($H_{(2,16)} = 7,4$; $p = 0,02$; Mann-Whitney: $p = 0,01$)

- **Tempo em postura de amamentação 24 h pós-parto (figura 5):**

Os animais do grupo salina permaneceram menos tempo em postura de amamentação durante a 1ª etapa da observação ($4,8 \pm 1,1$ min) quando comparada à 2ª etapa ($27,3 \pm 2,8$ min; Mann-Whitney: $p=0,02$).

O tratamento com agonista opióide (DAGO ou U-50488) não influenciou no tempo em postura de amamentação, na observação realizada 1 dia após o parto, quando comparado ao tratamento com salina (1ª etapa: $H_{(2,16)} = 1,45$ e $p = 0,48$; 2ª etapa: $H_{(2,16)} = 3,53$ e $p = 0,17$).

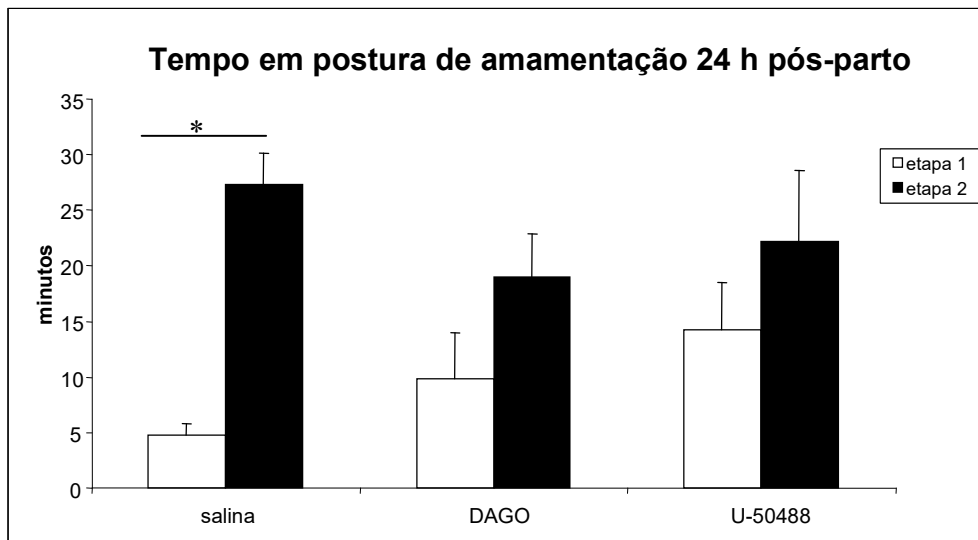


Figura 5: Tempo em postura de amamentação 24 h pós-parto (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou de agonista opióide (DAGO ou U-50488) nos NET, após o nascimento do 1º filhote. * diferença entre as barras indicada pelas extremidades da linha horizontal (Mann-Whitney: $p=0,02$).

- Tempo maternal 24 h pós-parto (figura 6):

Os animais tratados com salina permaneceram mais tempo em cuidados maternos durante a 1ª etapa ($15,9 \pm 3,4$ min) do que na 2ª etapa ($1,3 \pm 1,5$ min; Mann-Whitney: $p=0,02$). Essa diferença entre etapas não foi observada nos animais tratados com DAGO e U-50488.

Entre os animais tratados com agonista opióide, apenas o grupo que recebeu U-50488 apresentou durante a 1ª etapa da observação, uma tendência ($H_{(2,16)} = 5,08$; $p = 0,07$) a permanecer menos tempo em atividades maternas quando comparado aos animais tratados com salina.

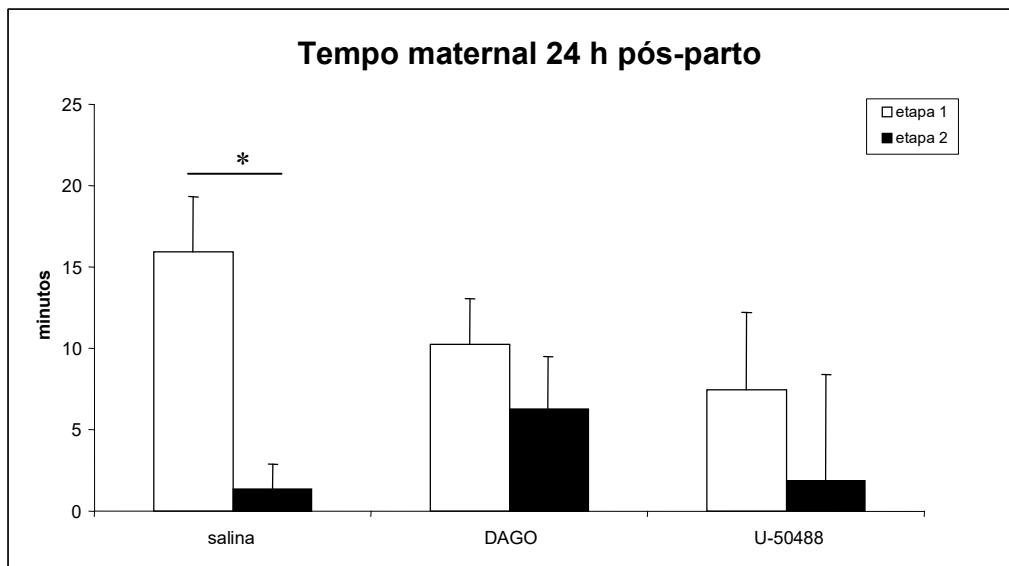


Figura 6: Tempo maternal 24 h pós-parto (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou de agonista opióide (DAGO ou U-50488) nos NET, após o nascimento do 1º filhote. * diferença entre as barras indicada pelas extremidades da linha horizontal (Mann-Whitney: $p=0,02$).

- Tempo não maternal 24 h pós-parto (figura 7):

Vinte e quatro horas após o parto, os animais do grupo salina permaneceram $9,2 \pm 3,3$ min em atividades não maternas na 1ª etapa e $1,3 \pm 1,3$ min na 2ª etapa da observação realizada.

O tratamento com agonista opióide (DAGO ou U-50488) no momento do parto, não apresentou diferença significativa no tempo não maternal 24 h pós-parto em nenhuma das 2 etapas da observação (1ª etapa: $H_{(2,16)} = 1,26$ e $p = 0,53$; 2ª etapa: $H_{(2,16)} = 3,56$; $p = 0,17$).

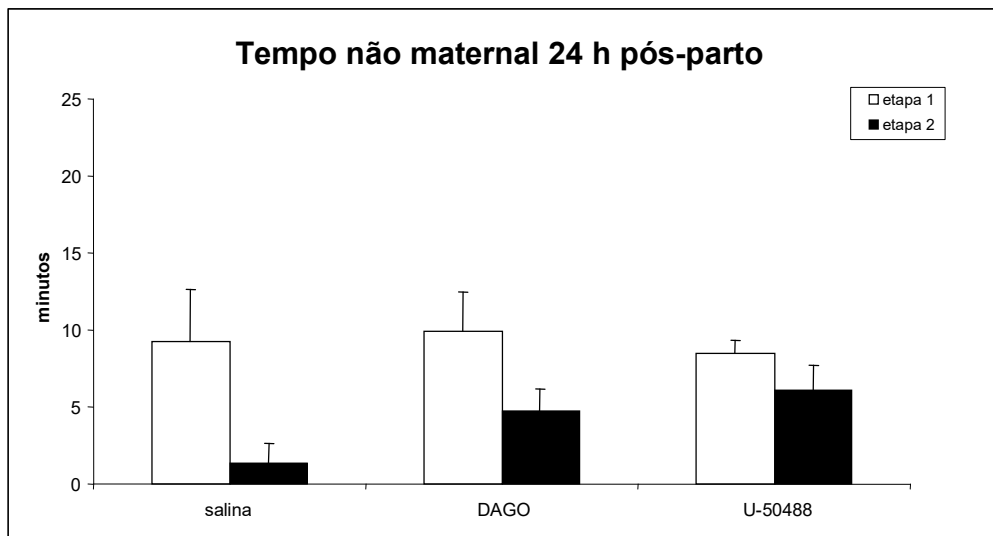


Figura 7: Tempo não maternal 24 h pós-parto (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou de agonista opióide (DAGO ou U-50488) nos NET, após o nascimento do 1º filhote. (1ª etapa: $H_{(2,16)} = 1,26$ e $p = 0,53$; 2ª etapa: $H_{(2,16)} = 3,56$; $p = 0,17$).

Experimento 2

2.1) Efeito da microinjeção de antagonista opióide não seletivo nos núcleos da estria terminal (NET) no progresso do parto

O número total de filhotes na ninhada variou entre 11 e 12 para o grupo controle não estresse (C), 11 e 12 para o grupo controle estresse (CE), 11 e 15 para o grupo naltrexona não estresse (N) e 11 e 13 para o grupo naltrexona estresse (NE). Como o número mínimo de filhotes por ninhada foi de 11, a análise do progresso do parto foi limitada a 8 filhotes, uma vez que a microinjeção nos NET ocorreu após o nascimento do 3º filhote. Da mesma forma procedeu-se à análise do recolhimento 24 h pós-parto onde apenas 8 filhotes foram analisados, apesar de todos os outros recolhimentos terem sido registrados. Ocasionalmente a microinjeção ocorreu após o nascimento do 4º filhote.

- Progresso do parto (figura 8):

O nascimento do 1º filhote das ratas controle não estressadas foi $12,4 \pm 2,7$ min após a microinjeção nos NET e o tempo de nascimento do 8º filhote pós-tratamento (último analisado) foi de $50,0 \pm 5,4$ min.

A situação de estresse não interferiu no progresso do parto, onde o tempo total registrado até o nascimento do 8º filhote pós-tratamento do grupo controle não estresse foi de $50,0 \pm 5,4$ min e do grupo controle estresse foi de $49,3 \pm 1,6$ min.

O tratamento com naltrexona nos NET logo após o nascimento do 3º filhote, também não causou nenhuma diferença significativa no progresso do parto. Portanto, nem a situação

de estresse nem o tratamento com naltrexona interferiram no progresso do parto ($F_{(3,15)} = 0,62$; $p = 0,61$).

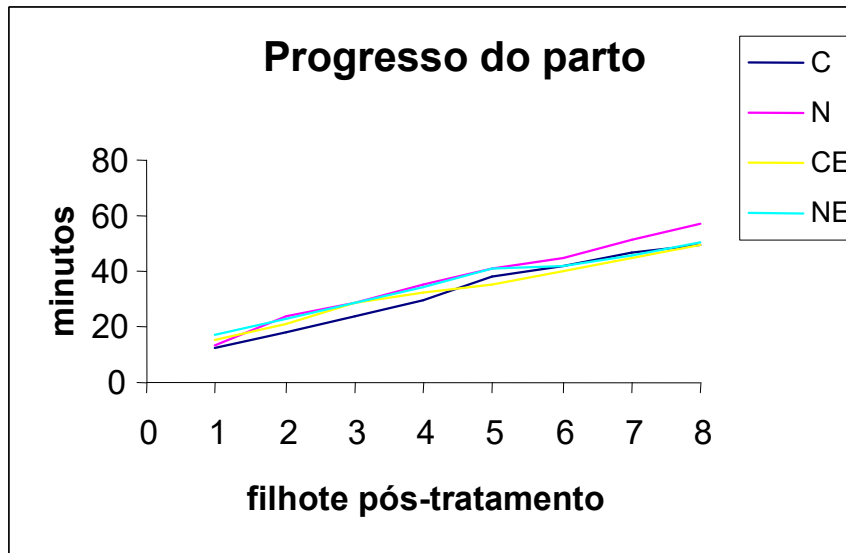


Figura 8: Progresso do parto (média). Efeito da microinjeção de salina ou de naltrexona nos NET após o nascimento do 3º filhote, em ratas submetidas ou não a estresse. ($F_{(3,15)} = 0,62$; $p = 0,61$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE).

- Número de filhotes nascidos 30 minutos após o tratamento (figura 9):

O número de filhotes nascidos 30 minutos após o tratamento no grupo controle não estresse foi de $3,6 \pm 0,6$ filhotes.

O fato das ratas serem submetidas a uma situação de estresse sócio-ambiental por um período de 30 minutos logo após a microinjeção não interferiu no número de filhotes nascidos durante este período (C: $3,6 \pm 0,6$; CE: $3,4 \pm 0,7$ filhotes; $F_{(3,23)} = 0,31$; $p = 0,82$). Bem como o tratamento com naltrexona, que não resultou em efeito sobre o número de filhotes nascidos 30 min após a microinjeção (N: $3 \pm 0,1$; NE: $3,8 \pm 0,6$ filhotes; $F_{(3,23)} = 0,31$; $p = 0,82$).

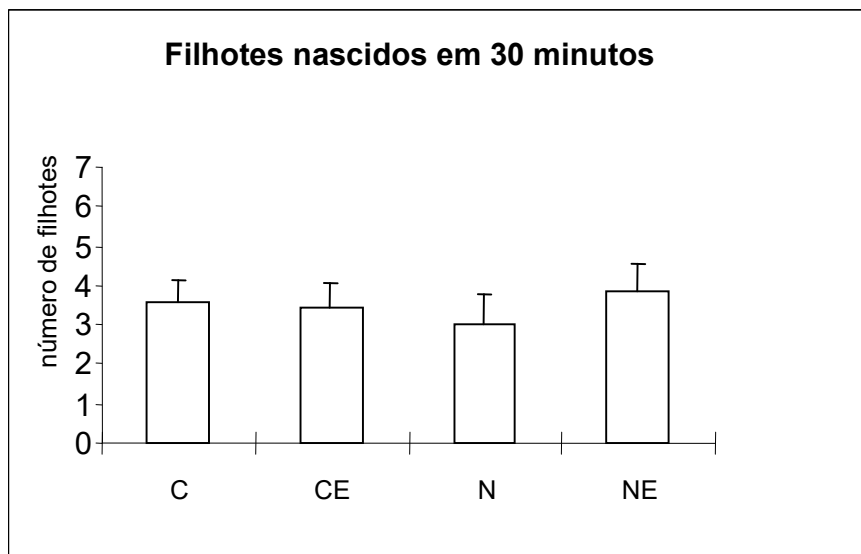


Figura 9: Número de filhotes nascidos em 30 minutos após o tratamento (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou de naltrexona nos NET após o nascimento do 3º filhote, em ratas submetidas ou não a estresse. ($F_{(3,23)} = 0,31$; $p = 0,82$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE).

- Recuperação dos filhotes 24 h pós-parto (figura 10):

A recuperação do 1º filhote do grupo controle não estresse 24 h pós-parto foi aos 9,1±5,8 min do início da observação e do 8º filhote foi aos 15,6±5,2 min.

A situação de estresse sócio-ambiental durante o parto ou o tratamento com naltrexona não alterou o tempo da recuperação dos filhotes ($F_{(3,21)} = 0,64$; $p = 0,59$).

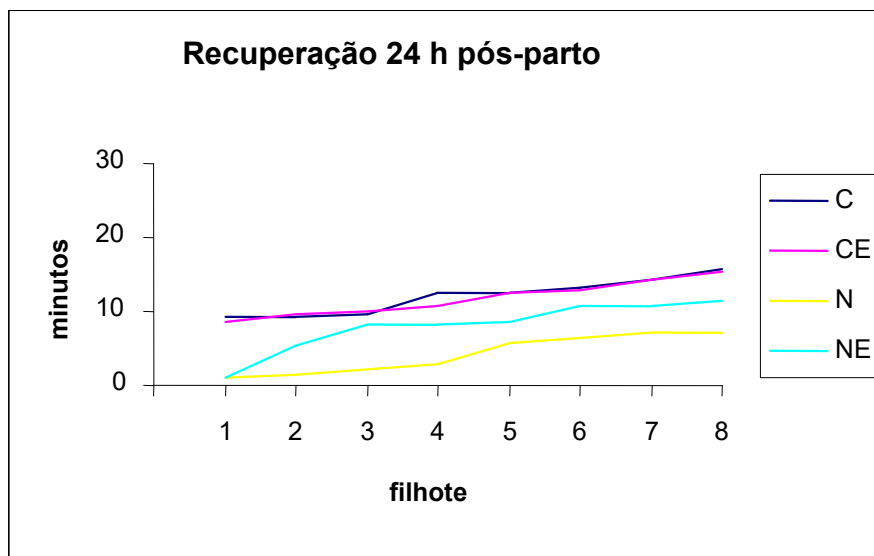


Figura 10: Recuperação dos filhotes 24 h pós-parto (média). Efeito da microinjeção de salina ou de naltrexona nos NET após o nascimento do 3º filhote, em ratas submetidas ou não a estresse. ($F_{(3,21)} = 0,64$; $p = 0,59$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE).

- Latência para o início da amamentação 24 h pós-parto (figura 11):

A latência para o início da amamentação foi de $27,3 \pm 2,3$ min para o grupo controle não estresse.

Ratas do grupo controle submetidas a estresse durante o parto não tiveram diferença significativa na latência para o início da amamentação quando comparadas às ratas não estressadas (C: $27,3 \pm 2,3$; CE: $21,8 \pm 2,5$ min; $H_{(3,26)} = 3,15$; $p = 0,36$).

O tratamento com naltrexona também não apresentou diferença estatística na latência para o início da amamentação 1 dia após o parto ($H_{(3,26)} = 3,15$; $p = 0,36$).

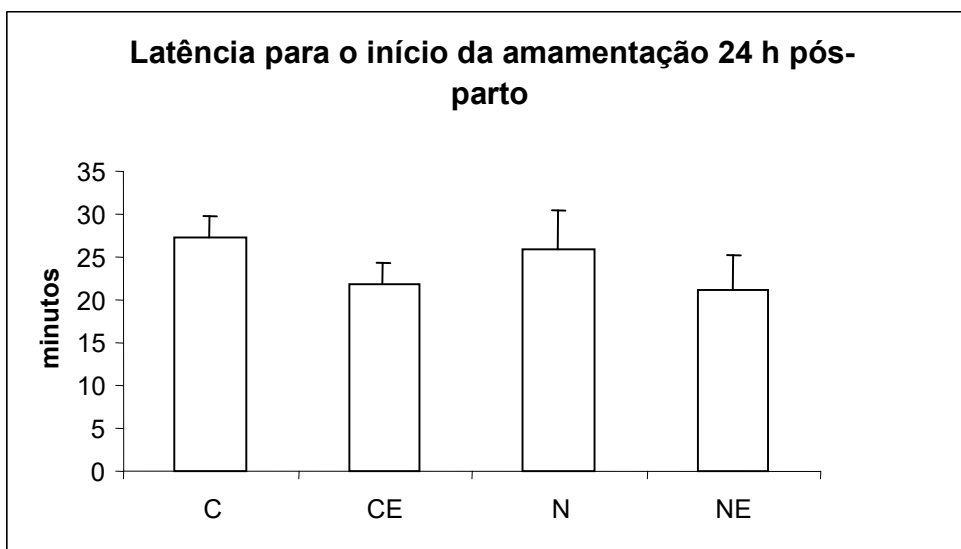


Figura 11: Latência para o início da amamentação 24 h pós-parto (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou de naltrexona nos NET após o nascimento do 3º filhote, em ratas submetidas ou não a estresse. ($H_{(3,26)} = 3,15$; $p = 0,36$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE).

- Tempo em postura de amamentação 24 h pós-parto (figura 12):

O tempo em postura de amamentação durante a observação realizada 24 h após o parto não foi diferente entre etapas para o grupo controle não estresse (1ª etapa: $0,7 \pm 0,6$; 2ª etapa: $9,0 \pm 4,7$ min).

Os tratamentos pelos quais os animais foram submetidos (droga/situação sócio-ambiental) não apresentaram diferença significativa em nenhuma das 2 etapas de observação (1ª etapa: $H_{(3,26)} = 3,84$ e $p = 0,27$; 2ª etapa: $H_{(3,26)} = 3,77$ e $p = 0,28$).

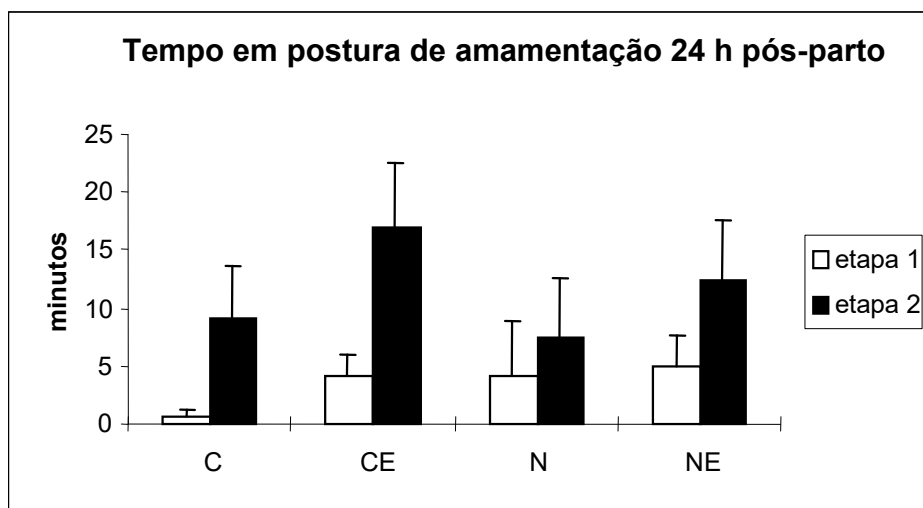


Figura 12: Tempo em postura de amamentação 24 h pós-parto (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou de naltrexona nos NET após o nascimento do 3º filhote, em ratas submetidas ou não a estresse. (1ª etapa: $H_{(3,26)} = 3,84$ e $p = 0,27$; 2ª etapa: $H_{(3,26)} = 3,77$ e $p = 0,28$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE).

- Tempo maternal 24 h pós-parto (figura 13):

O tempo maternal 24 h pós-parto das ratas controle não estresse foi de $11,7 \pm 3,7$ min na 1ª etapa e de $6,3 \pm 3,2$ min na 2ª etapa da observação.

O estresse sócio-ambiental durante 30 minutos no parto não interferiu no tempo maternal 24 h pós-parto, em nenhuma das etapas (C 1ª etapa: $11,7 \pm 3,7$; C 2ª etapa: $6,3 \pm 3,2$; CE 1ª etapa: $9,4 \pm 1,9$; CE 2ª etapa: $4,6 \pm 2,6$ min). Animais tratados com naltrexona, não apresentaram diferença no tempo despendido em atividades maternas (24 h pós-parto) durante as 2 etapas (N 1ª etapa: $8,4 \pm 2,8$; N 2ª etapa: $6,9 \pm 3,3$; NE 1ª etapa: $8,63 \pm 2,3$; NE 2ª etapa: $8,09 \pm 3,0$ min). Assim sendo nem o estresse nem a naltrexona alteraram o tempo maternal 24 após o parto (1ª etapa: $H_{(3,26)} = 1,13$ e $p = 0,76$; 2ª etapa: $H_{(3,26)} = 1,88$ e $p = 0,59$).

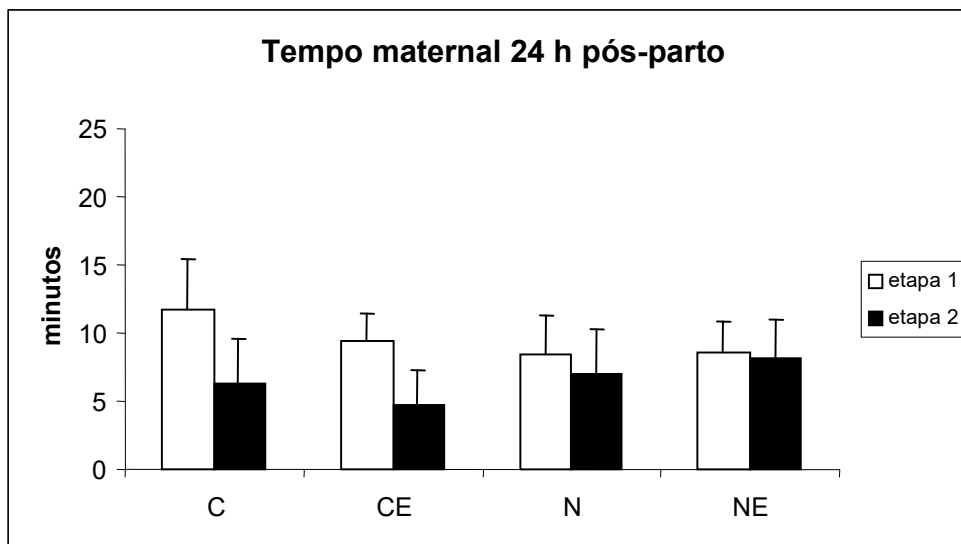


Figura 13: Tempo maternal 24 h pós-parto (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou de naltrexona nos NET após o nascimento do 3º filhote, em ratas submetidas ou não a estresse. (1ª etapa: $H_{(3,26)} = 1,13$ e $p = 0,76$; 2ª etapa: $H_{(3,26)} = 1,88$ e $p = 0,59$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE).

- Tempo não maternal 24 h pós-parto (figura 14):

O tempo em atividades não maternais 24 h pós-parto entre as 2 etapas para o grupo controle não estresse não foi diferente estatisticamente (1ª etapa: 18,1±4,0; 2ª etapa: 15,1±5,5 min).

Entre os animais dos grupos controle, não foi observada nenhuma diferença significativa no tempo não maternal (C 1ª etapa: 18,1±4,0; C 2ª etapa: 15,1±5,5; CE 1ª etapa: 17,0±3,3; CE 2ª etapa: 8,9±4,9 min). Naltrexona nos NET após o nascimento do 3º filhote, não interferiu no tempo não maternal 24 h pós-parto. (C 1ª etapa: 18,1±4,0; C 2ª etapa: 15,1±5,5; N 1ª etapa: 17,9±4,3; N 2ª etapa: 16,1±4,8 min). Desta forma, não foi verificada diferença estatística entre tratamentos nos grupos analisados durante as 2 etapas da observação (1ª etapa: $H_{(3,26)} = 0,11$ e $p = 0,99$; 2ª etapa: $H_{(3,26)} = 2,97$ e $p = 0,39$).

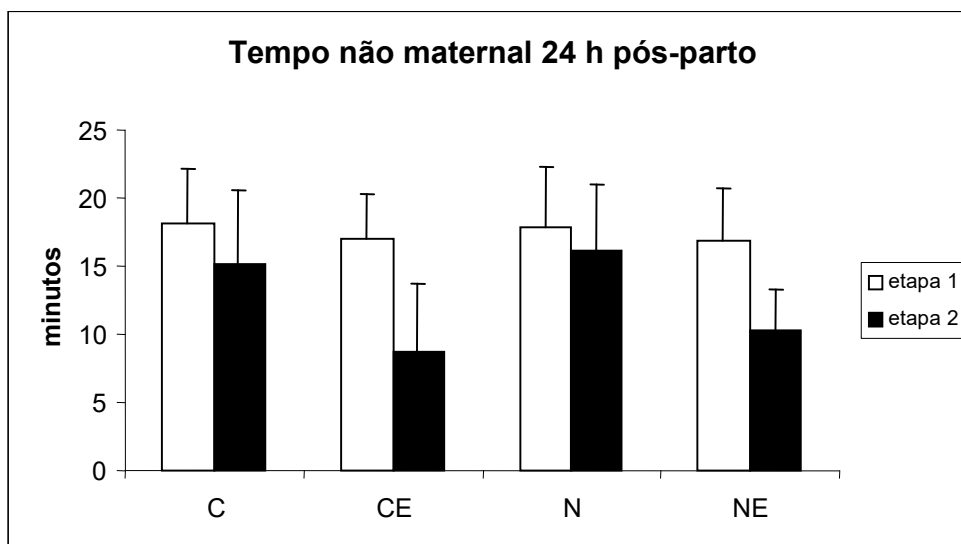


Figura 14: Tempo não maternal 24 h pós-parto (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou de naltrexona nos NET após o nascimento do 3º filhote, em ratas submetidas ou não a estresse. (1ª etapa: $H_{(3,26)} = 0,11$ e $p = 0,99$; 2ª etapa: $H_{(3,26)} = 2,97$ e $p = 0,39$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE).

2.2) Efeito da microinjeção de antagonistas opióides nos núcleos da estria terminal no comportamento maternal e lactação

- Recuperação dos filhotes (figura 15):

A recuperação do 8º filhote do grupo controle não estresse foi aos $9,5 \pm 3,5$ min do tempo total de observação da 1ª etapa.

O tempo de recuperação dos filhotes não foi alterado pelo estresse (C: $9,5 \pm 3,5$; CE: $21,0 \pm 4,7$ min). Mas foi observada uma diferença estatística entre o grupo controle estresse com os grupos não estressados tratados com antagonista opióide ($F_{(7,53)} = 2,33$; $p = 0,04$), de forma que o grupo controle estresse demorou mais para recuperar seus filhotes quando comparado com os grupos não estressados tratados com antagonista opióide (N x CE: $p = 0,01$, fig 15a; B x CE: $p = 0,01$, fig. 15b; NZ x CE: $p = 0,008$, fig. 15c).

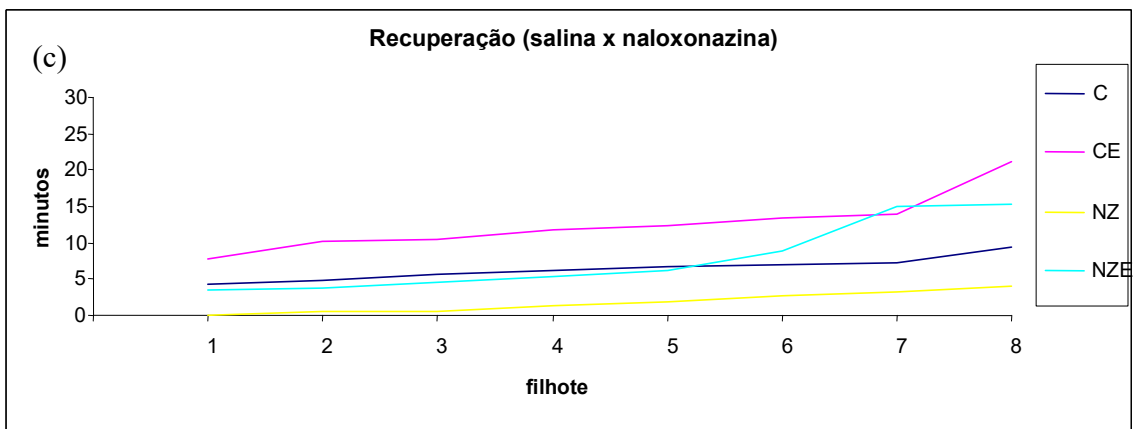
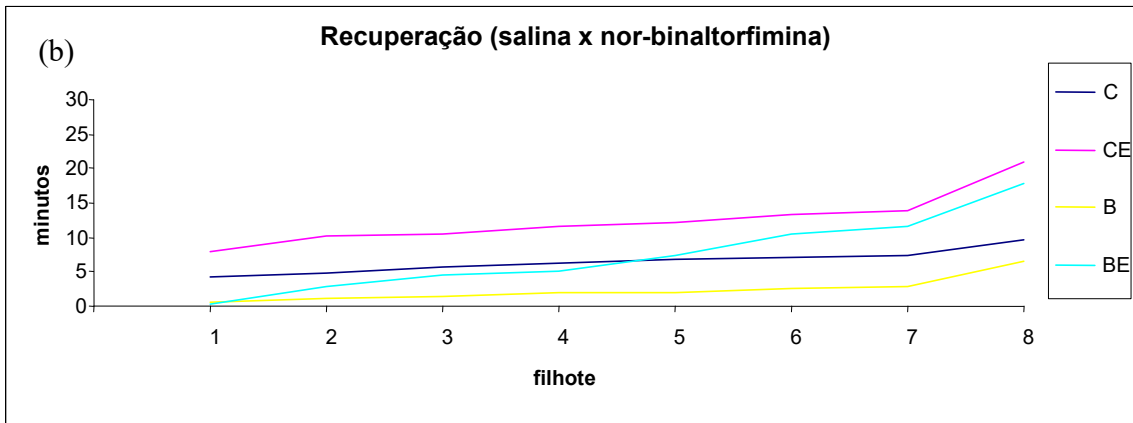
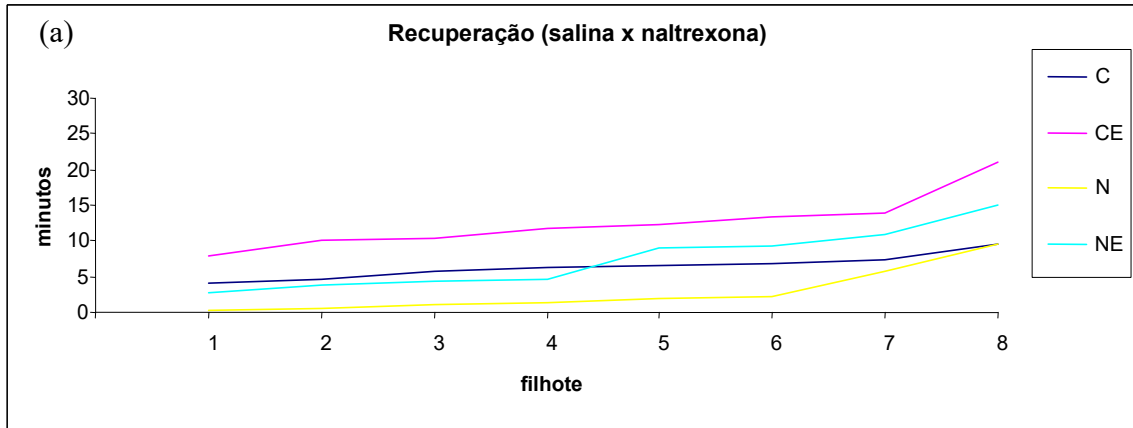


Figura 15: Recolhimento dos filhotes (média). Efeito da microinjeção de salina ou de antagonistas opióides nos NET em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. ($F_{(7,53)} = 2,33$; $p = 0,04$; Duncan: N x CE, B x CE, NZ x CE, $p \leq 0,05$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE), Nor-binaltorfimina não estresse (B), Nor-binaltorfimina estresse (BE), Naloxonazina não estresse (NZ), Naloxonazina estresse (NZE).

- Latência para o início da amamentação (figura 16):

O grupo controle não estresse demorou $10,2 \pm 1,1$ min e $8,3 \pm 3,8$ min para iniciar a amamentação na 1ª etapa e 2ª etapa respectivamente.

A situação de estresse e o tratamento com antagonista opióide nos NET não alteraram o tempo das lactantes para o início da amamentação durante as etapas do teste. Desta forma, não foi observada diferença estatística entre os grupos (1ª etapa: $H_{(7,61)} = 8,31$ e $p = 0,30$; 2ª etapa: $H_{(7,61)} = 5,62$ e $p = 0,58$).

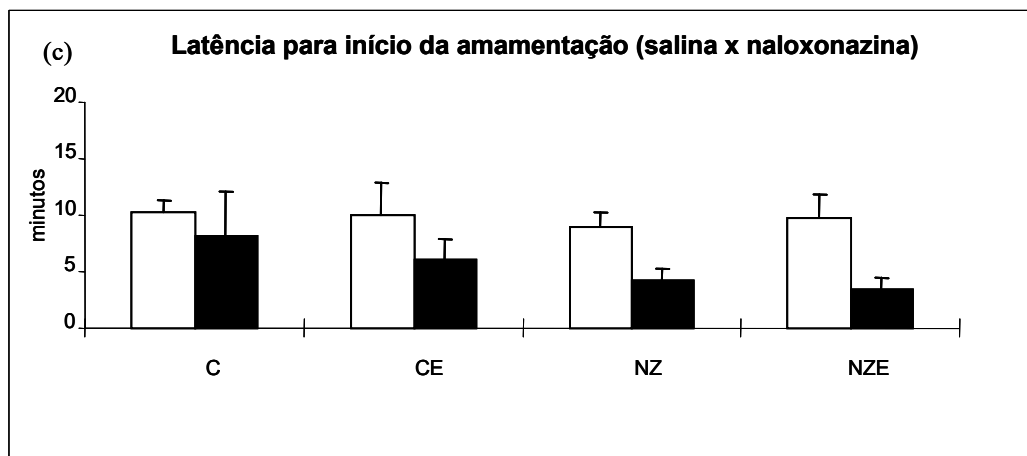
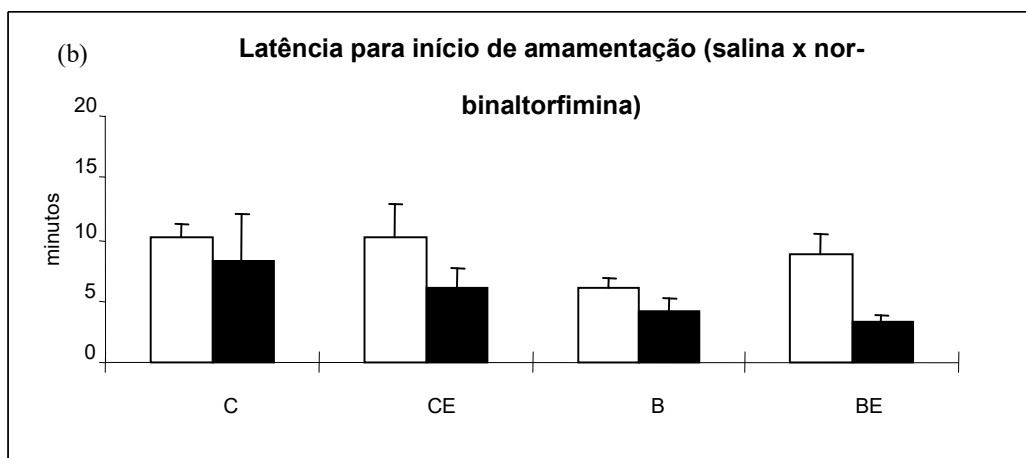
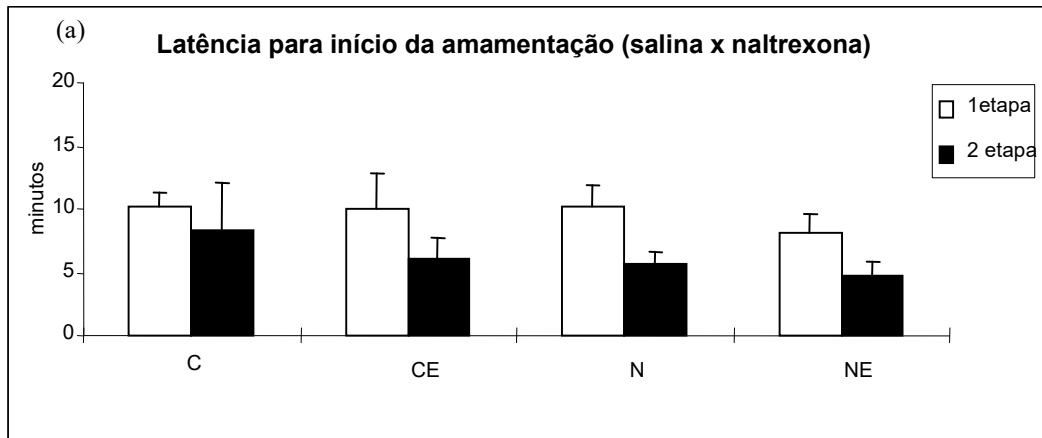


Figura 16: Latência para o início da amamentação (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou de antagonistas opióides nos NET em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. (1ª etapa: $H_{(7,61)} = 8,31$ e $p = 0,30$; 2ª etapa: $H_{(7,61)} = 5,62$ e $p = 0,58$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE), Norbinaltorfimina não estresse (B), Norbinaltorfimina estresse (BE), Naloxonazina não estresse (NZ), Naloxonazina estresse (NZE).

- Tempo de construção do ninho (figura 17):

Na 1ª etapa, o grupo controle não estresse permaneceu $0,2 \pm 0,2$ min manipulando material para a construção do ninho e na 2ª etapa permaneceu $0,4 \pm 0,2$ min.

A situação de estresse não interferiu no tempo de construção do ninho (C 1ª etapa: $0,2 \pm 0,2$; C 2ª etapa: $0,4 \pm 0,2$; CE 1ª etapa: $0,1 \pm 0,1$; CE 2ª etapa: $0,4 \pm 0,4$ min). Não foi observada diferença no tempo de construção do ninho entre as lactantes que receberam a microinjeção de antagonista opióide. Logo, o tratamento com antagonista opióide ou a situação de estresse não interferiram no tempo em que as lactantes manipularam material para a construção do ninho durante as etapas do teste (1ª etapa: $H_{(7,61)} = 9,68$ e $p = 0,20$; 2ª etapa: $H_{(7,61)} = 11,95$ e $p = 0,10$).

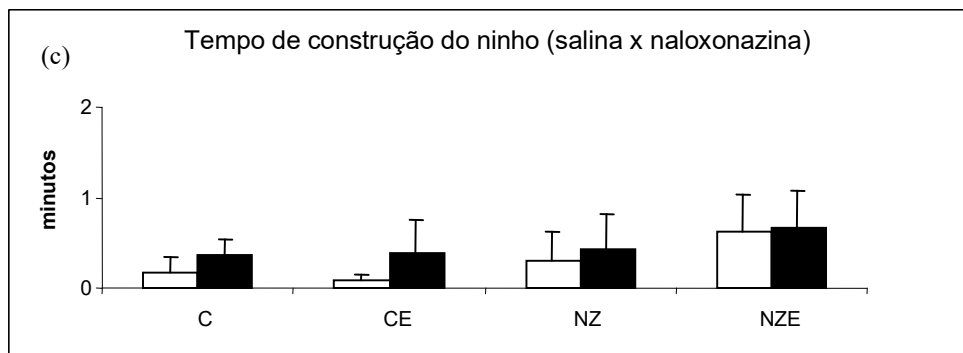
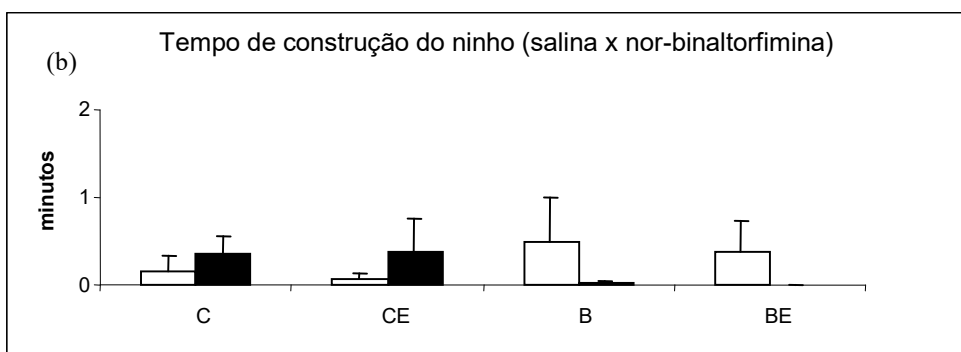
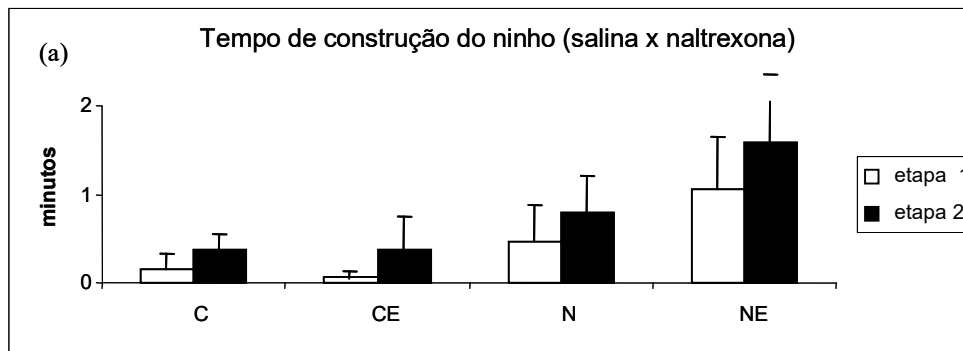


Figura 17: Tempo de construção do ninho (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou de antagonistas opióides nos NET em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. (1ª etapa: $H_{(7,61)} = 9,68$ e $p = 0,20$; 2ª etapa: $H_{(7,61)} = 11,95$ e $p = 0,10$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE), Nor-binaltorfimina não estresse (B), Nor-binaltorfimina estresse (BE), Naloxonazina não estresse (NZ), Naloxonazina estresse (NZE).

- Tempo maternal (figura 18):

Durante as 2 etapas do teste, as ratas controle não estressadas não apresentaram diferença estatística no tempo em atividades maternas (1ª etapa: $5,3 \pm 1,3$; 2ª etapa: $2,7 \pm 0,8$ min).

O tempo maternal não foi afetado pelo estresse em nenhuma das 2 etapas (C 1ª etapa: $5,3 \pm 1,3$; C 2ª etapa: $2,7 \pm 0,8$; CE 1ª etapa: $3,0 \pm 0,9$; CE 2ª etapa $1,3 \pm 0,4$ min). O tratamento com antagonista opióide não causou diferença entre grupos. Porém, houve diferença entre etapas para o grupo naltrexona não estresse que permaneceu mais tempo em atividades maternas durante a 1ª etapa do teste quando comparada a 2ª etapa (1ª etapa: $8,3 \pm 1,8$; 2ª etapa: $3,5 \pm 1,0$ min; $p = 0,02$; fig. 18a).

Mas de toda forma, a situação de estresse e a microinjeção de antagonista opióide não causou diferença estatística entre os grupos durante as etapas do teste (1ª etapa: $H_{(7,61)} = 12,16$ e $p = 0,09$; 2ª etapa: $H_{(7,61)} = 9,36$ e $p = 0,22$).

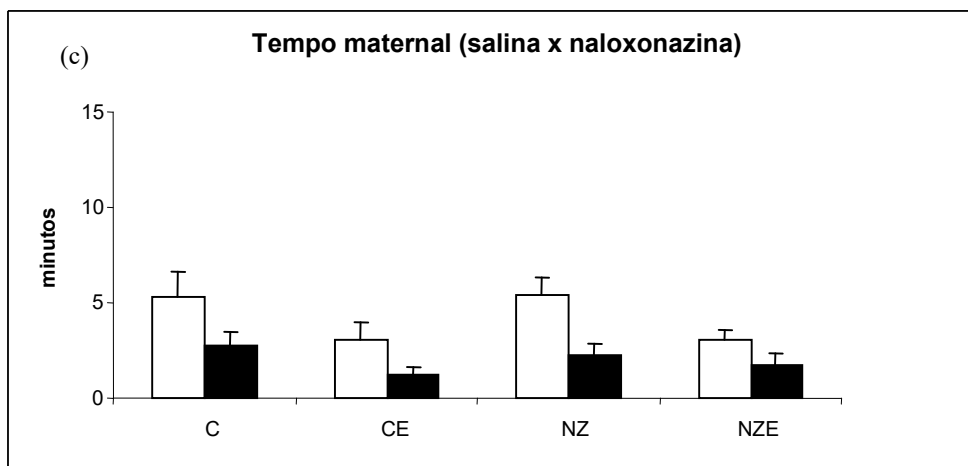
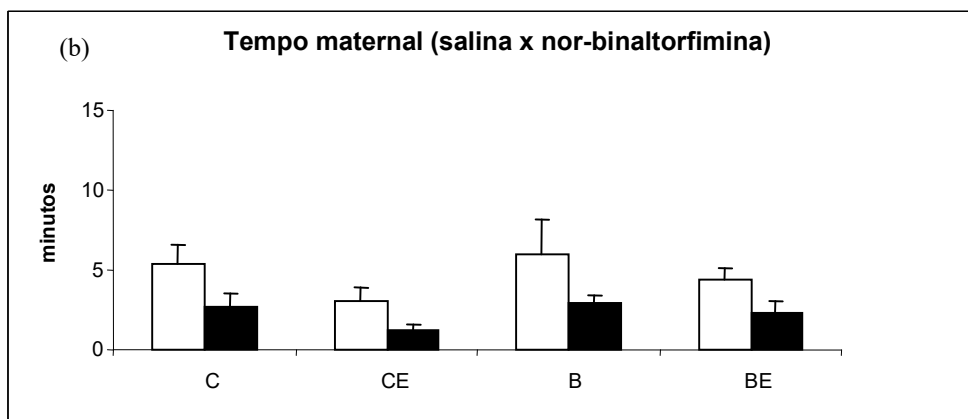
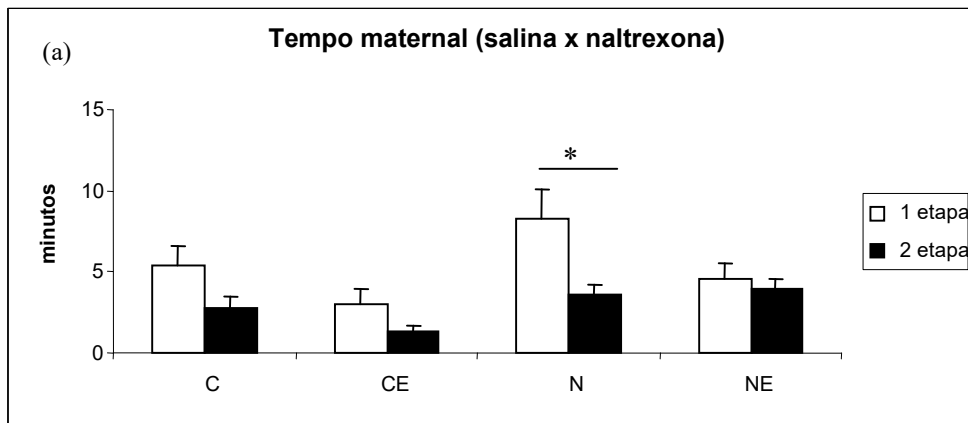


Figura 18: Tempo maternal (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou de antagonistas opióides nos NET em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. * diferença entre as barras indicada pelas extremidades das linhas horizontais (Mann-Whitney: $p= 0,02$). Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE), Nor-binaltorfimina não estresse (B), Nor-binaltorfimina estresse (BE), Naloxonazina não estresse (NZ), Naloxonazina estresse (NZE).

- Tempo não maternal (figura 19):

As lactantes do grupo controle não estresse permaneceram $10,7 \pm 3,2$ e $9,3 \pm 3,3$ min em atividades não maternais durante a 1ª etapa e 2ª etapa do teste, respectivamente.

A situação de estresse sócio-ambiental não alterou este comportamento das lactantes em nenhuma das 2 etapas (C 1ª etapa: $10,7 \pm 3,2$; C 2ª etapa: $9,3 \pm 3,3$; CE 1ª etapa: $8,2 \pm 3,0$; CE 2ª etapa: $5,4 \pm 1,6$ min).

O tratamento com antagonista opióide nos NET não causou diferença estatística entre os grupos durante a 1ª etapa ($H_{(7,61)} = 11,62$; $p = 0,11$). Entretanto, durante a 2ª etapa foram encontradas diferenças significativas entre grupos ($H_{(7,61)} = 15,68$; $p = 0,02$). O tratamento com nor-binaltorfimina ou com naloxonazina em lactantes não estressadas fez com que estas permanecessem menos tempo em atividades não maternais durante a 2ª etapa do teste quando comparadas às lactantes não estressadas do grupo controle (B x C: $p = 0,006$, fig. 19b; NZ x C: $p = 0,01$, fig. 19c). O tratamento com naltrexona resultou em apenas uma tendência ($p = 0,07$, fig. 19a) a diminuir o tempo não maternal dos animais não estressados durante a 2ª etapa do teste. Nor-binaltorfimina em ratas estressadas diminuiu o tempo não maternal durante a 2ª etapa ($p = 0,02$, fig. 19b).

Foi observada uma diferença estatística entre os animais estressados tratados com nor-binaltorfimina ou naloxonazina e os não estressados do grupo controle, onde os estressados e tratados com antagonista opióide permaneceram menos tempo em atividades não maternais durante a 2ª etapa do que os não estressados do grupo controle (BE x C: $p = 0,02$, fig. 19b; NZE x C: $p = 0,01$, fig. 19c).

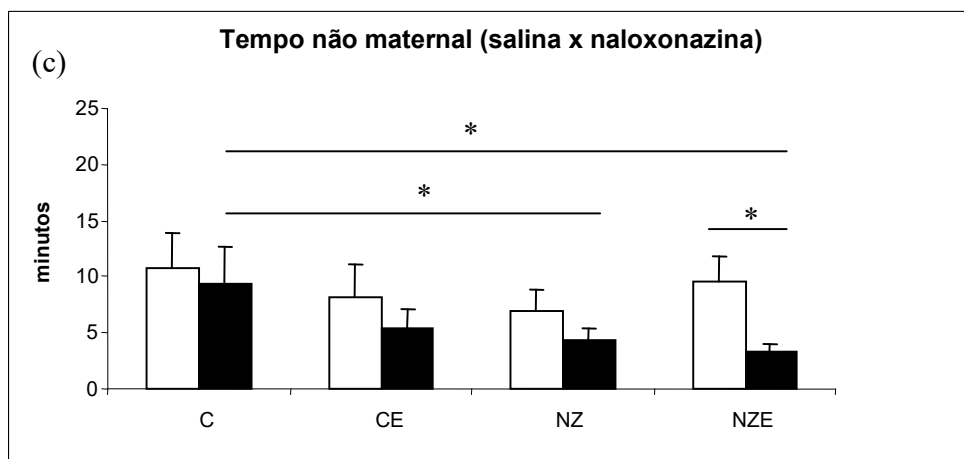
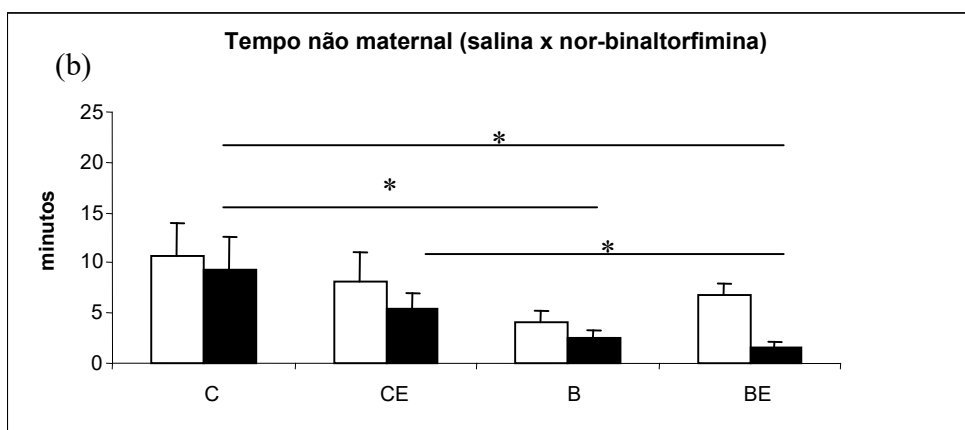
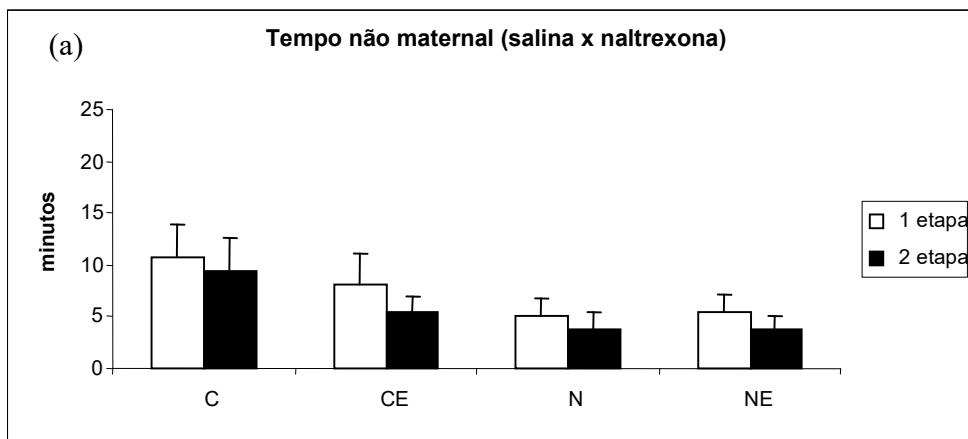


Figura 19: Tempo não maternal (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou de antagonistas opióides nos NET em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. * diferença entre as barras indicada pelas extremidades das linhas horizontais ($H_{(7,61)} = 15,68$ e $p = 0,02$; Mann-Whitney: $p \leq 0,05$). Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE), Nor-binaltorfimina não estresse (B), Nor-binaltorfimina estresse (BE), Naloxonazina não estresse (NZ), Naloxonazina estresse (NZE).

- Tempo total (figura 20):

O tempo total necessário para completar 15 minutos de amamentação não apresentou diferença estatística entre as 2 etapas para o grupo controle não estresse (1ª etapa: 28,8±1,4; 2ª etapa 24,8±1,5 min).

Animais do grupo controle não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si (C 1ª etapa: 28,8±1,4; C 2ª etapa 24,8±1,5; CE 1ª etapa 26,0±2,6; CE 2ª etapa 21,4±1,6 min). Antagonistas opióides no NET das lactantes não causou diferença estatística entre grupos no tempo total das 2 etapas do teste. Desta forma, nenhum dos tratamentos pelos quais as lactantes foram submetidas (estresse ou droga) foi capaz de alterar o tempo total das etapas quando realizada uma comparação entre grupos (1ª etapa: $H_{(7,61)} = 7,91$ e $p = 0,33$; 2ª etapa: $H_{(7,61)} = 10,76$ e $p = 0,14$).

Entretanto, quando se comparou etapas do mesmo grupo, foi observado que os animais tratados com naloxonazina (estressados e não stressados) e com nornalatorfimina (estressados) foram mais demorados durante a 1ª etapa do que na 2ª etapa do teste (NZ 1ª etapa: 19,7±1,2; NZ 2ª etapa: 27,1±1,9; NZE 1ª etapa: 24,8±1,9; NZE 2ª etapa: 22,3±2,3; BE 1ª etapa: 22,8±1,3; BE 2ª etapa: 19,9±0,9 min $p \leq 0,05$; fig 20b e 20c) para completar os 15 minutos de amamentação.

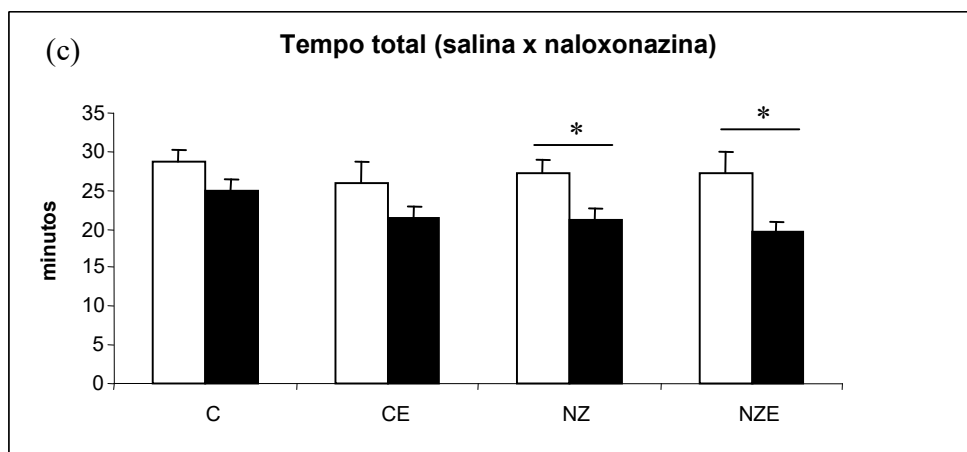
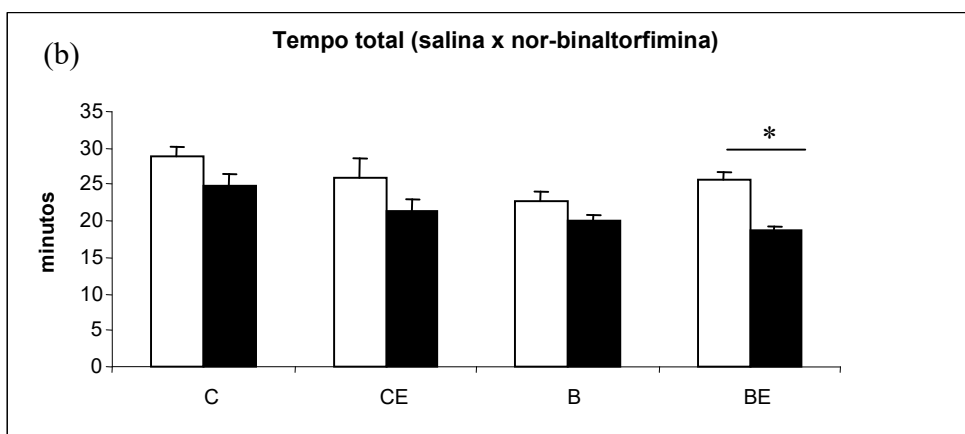
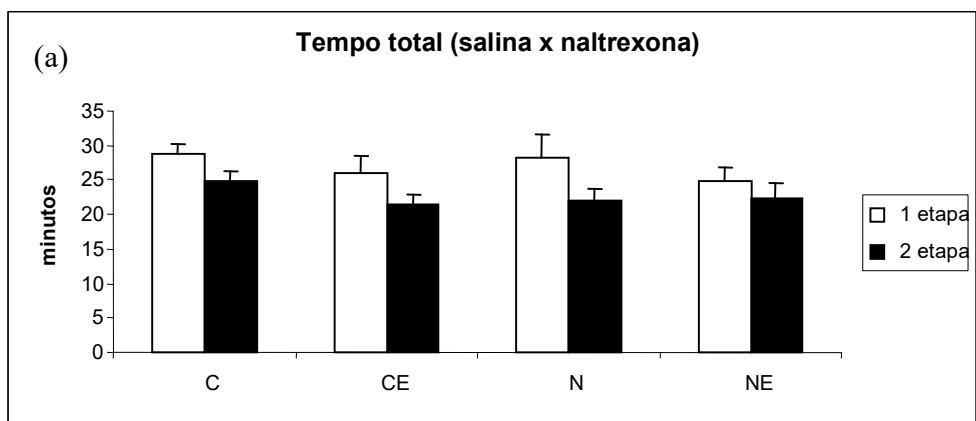


Figura 20: Tempo total necessário para completar 15 minutos de amamentação (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou de antagonistas opióides nos NET em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. * diferença entre as barras indicada pelas extremidades das linhas horizontais (Mann-Whitney: $p \leq 0,05$). Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE), Nor-binaltorfimina não estresse (B), Nor-binaltorfimina estresse (BE), Naloxonazina não estresse (NZ), Naloxonazina estresse (NZE).

- Ganho de peso dos filhotes (figura 21):

Os filhotes das ratas controle não estressadas não apresentaram diferença significativa no ganho de peso entre as etapas (1ª etapa: $0,6 \pm 0,3$; 2ª etapa: $0,8 \pm 0,2\%$); e tiveram um aumento $1,4 \pm 0,5\%$ do peso inicial ao final das 2 etapas.

O ganho de peso dos filhotes não sofreu interferência da situação de estresse pela qual as ratas foram submetidas durante o teste (C: $1,4 \pm 0,3$; CE: $4,1 \pm 1,1\%$; $F_{(7,53)} = 1,16$; $p = 0,34$).

O tratamento com antagonista opióide nos NET das lactantes não causou diferença significativa no peso dos filhotes ($F_{(7,53)} = 1,16$; $p = 0,34$).

Entretanto foi observada uma tendência no grupo naltrexona não estresse, onde seus filhotes tenderam a ganhar mais peso durante a 2ª etapa do teste ($F_{(1,53)} = 3,59$; $p = 0,06$; fig. 21a).

O ganho de peso total dos filhotes não teve diferença entre os grupos analisados ($F_{(7,53)} = 1,18$; $p = 0,33$).

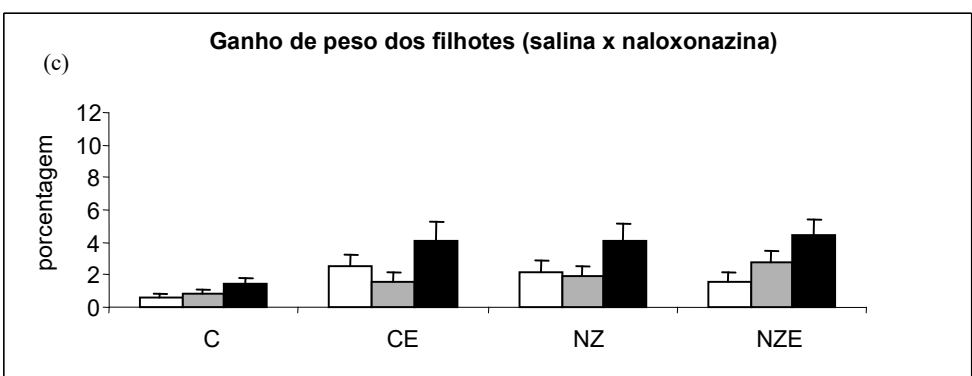
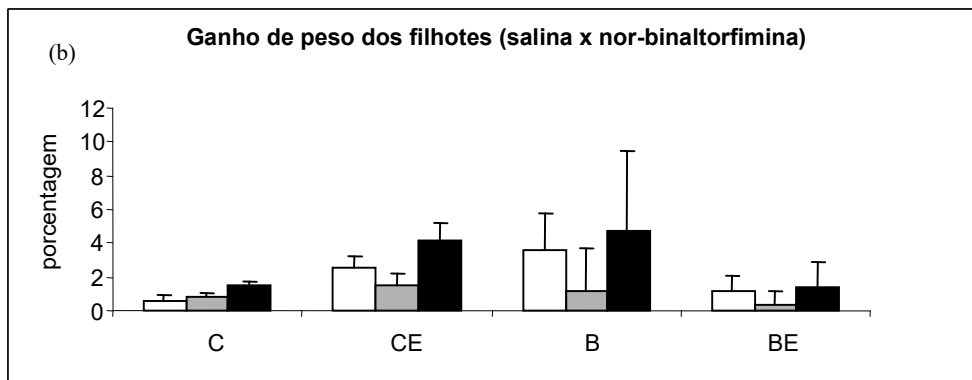
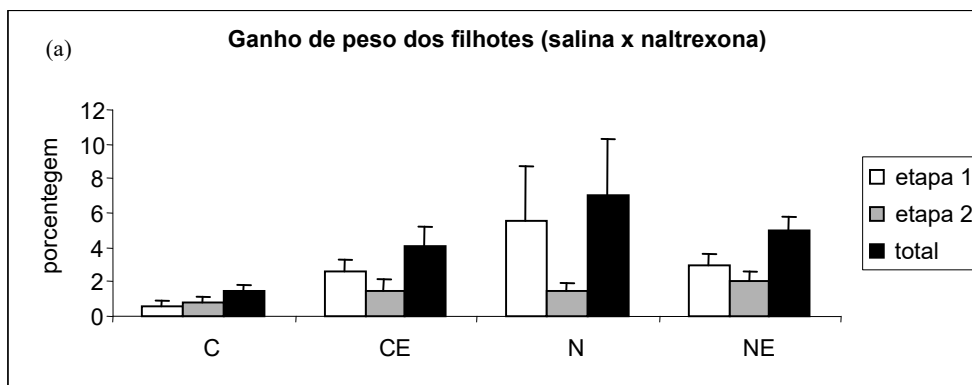


Figura 21: Ganho de peso dos filhotes (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou de antagonistas opióides nos NET em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. ($F_{(7,53)} = 1,16$; $p = 0,34$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE), Nor-binaltorfimina não estresse (B), Nor-binaltorfimina estresse (BE), Naloxonazina não estresse (NZ), Naloxonazina estresse (NZE).

- Modo de início da amamentação (figura 22):

O modo de iniciar a amamentação foi parecido em ambas as etapas no grupo controle não estresse, onde a maioria das ratas aproximou-se dos filhotes e se posicionou para amamentar (modo de início 4).

A mudança de ambiente associada à presença de um rato macho (estresse sócio-ambiental), não interferiu na forma de iniciar a amamentação nos animais controle. Bem como o tratamento com antagonista opióide não causou diferença no modo de início da amamentação. Desta forma, nem o estresse nem o tratamento com antagonista opióide alterou a forma pela qual as ratas iniciaram a amamentação nas 2 etapas do teste (1ª etapa: $H_{(7,61)} = 9,77$ e $p = 0,20$; 2ª etapa: $H_{(7,61)} = 4,35$ e $p = 0,74$).

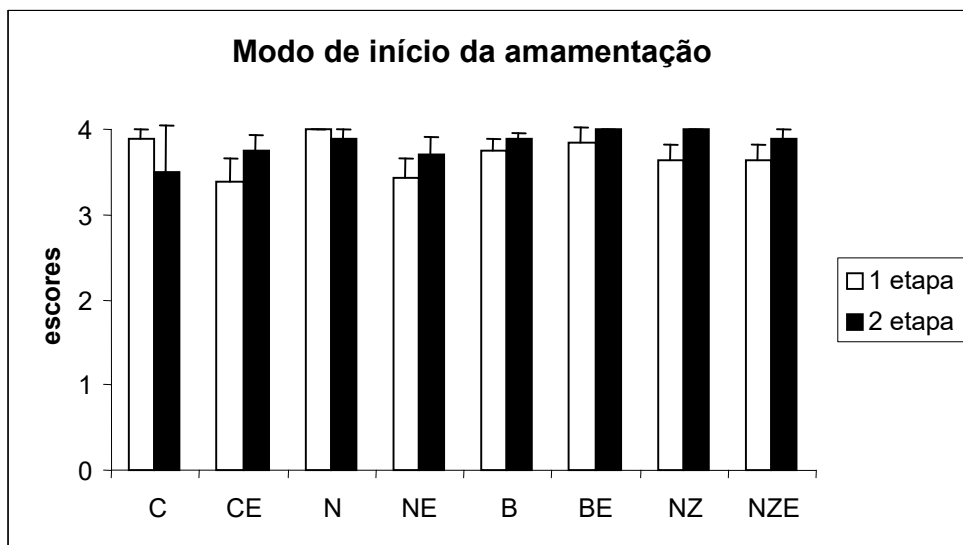


Figura 22: Modo de início da amamentação. Efeito da microinjeção de salina ou de antagonistas opióides nos NET em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. (1ª etapa: $H_{(7,61)} = 9,77$ e $p = 0,20$; 2ª etapa: $H_{(7,61)} = 4,35$ e $p = 0,74$). Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE), Nor-binaltorfimina não estresse (B), Nor-binaltorfimina estresse (BE), Naloxonazina não estresse (NZ), Naloxonazina estresse (NZE).

- Número de filhotes no ninho (figura 23):

Ao final de cada etapa, o grupo controle não estresse teve uma média de $6,7 \pm 1,0$ filhotes no ninho.

A quantidade de filhotes no ninho (observada a cada 5 minutos durante os 30 minutos iniciais de observação de cada etapa) não foi diferente entre os grupos controle, não havendo interferência do estresse sobre este parâmetro quantificado.

Animais tratados com antagonista opióide não apresentaram diferença significativa no número de filhotes no ninho quando comparados entre si. Logo, tanto a situação de estresse quanto o tratamento com antagonista opióide não alterou significativamente o número de filhotes no ninho durante as etapas do teste (1ª etapa: $H_{(7,61)} = 5,76$ e $p = 0,56$; 2ª etapa: $H_{(7,61)} = 8,95$ e $p = 0,25$).

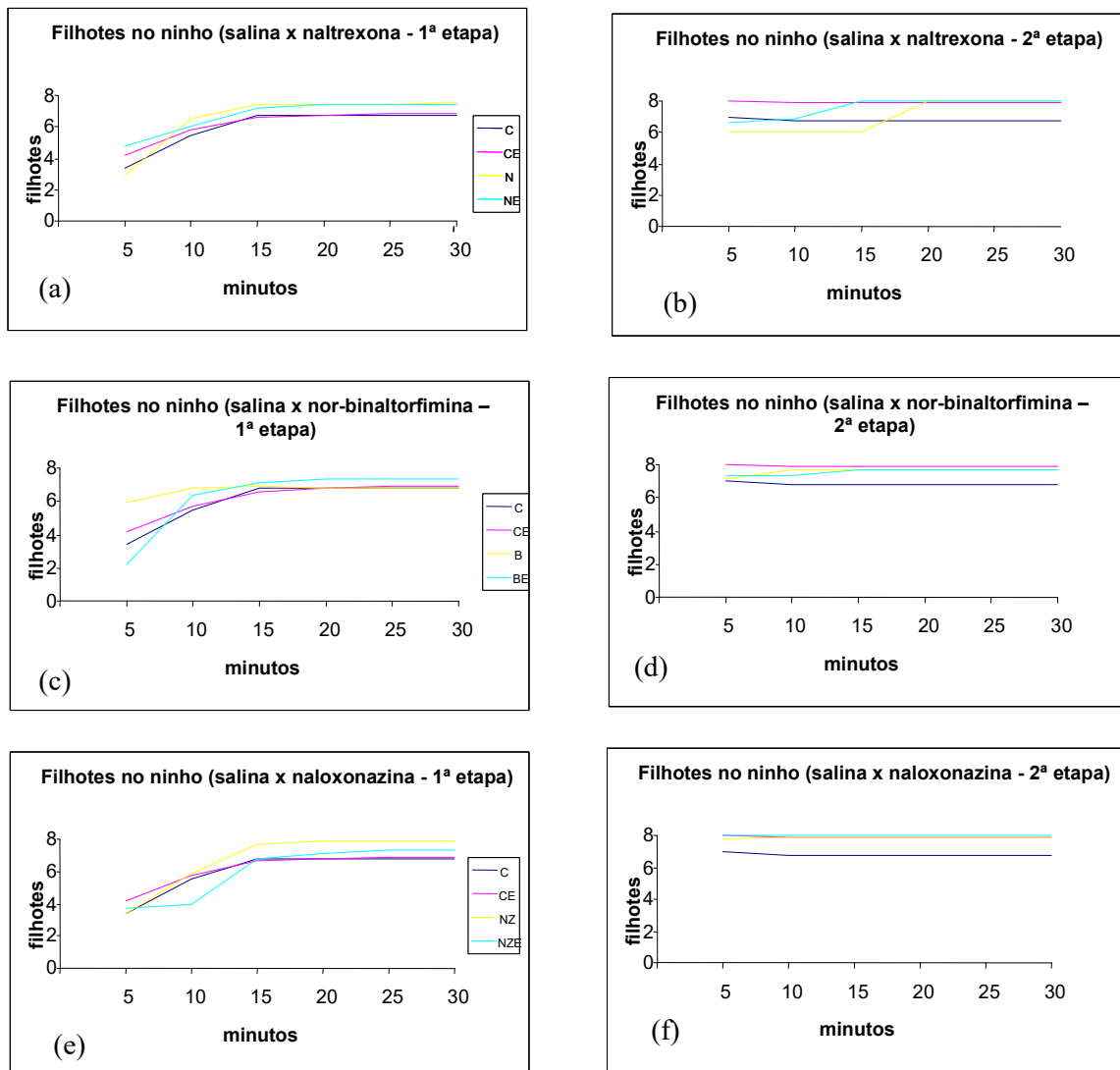


Figura 23: Filhotes no ninho (média). Efeito da microinjeção de salina ou de antagonistas opióides nos NET em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. (1ª etapa: $H_{(7,61)} = 5,76$ e $p = 0,56$; 2ª etapa: $H_{(7,61)} = 8,95$ e $p = 0,25$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Naltrexona não estresse (N), Naltrexona estresse (NE), Nor-binaltorfimina não estresse (B), Nor-binaltorfimina estresse (BE), Naloxonazina não estresse (NZ), Naloxonazina estresse (NZE).

Experimento 3

3.1) Efeito da microinjeção bilateral de agonista GABA_a na amígdala no progresso do parto

O número de filhotes na ninhada variou entre 11 e 14 para o grupo controle não estresse (C), 11 e 13 para o grupo controle estresse (CE), 11 e 14 para o grupo muscimol não estresse (M) e 11 e 13 para o grupo muscimol estresse (ME). Como o número mínimo de filhotes por ninhada foi de 11, a análise do progresso do parto foi limitada a 8 filhotes, uma vez que a microinjeção bilateral na amígdala ocorreu após o nascimento do 3º filhote (ocasionalmente após o 4º filhote). Da mesma forma procedeu-se à análise do recolhimento 24 h pós-parto, porém todos os recolhimentos 24 h pós-parto foram registrados.

- Progresso do parto (figura 24):

O tempo de nascimento dos filhotes não foi diferente estatisticamente entre os grupo analisados ($F_{(3,22)} = 2,59$; $p = 0,08$).

A situação de estresse não interferiu no progresso do parto, o nascimento do 8º filhote pós-tratamento (último analisado) do grupo controle não estresse foi $44,8 \pm 5,0$ min após a microinjeção e o 8º filhote do grupo controle estresse demorou $51,2 \pm 8,1$ min para nascer, não havendo uma diferença estatística entre o tempo total do progresso do parto entre os grupos controle. Ratas tratadas com muscimol no momento do parto não apresentaram diferença no tempo total do progresso do parto (M: $59,8 \pm 9,0$; ME: $66,8 \pm 8,1$ min).

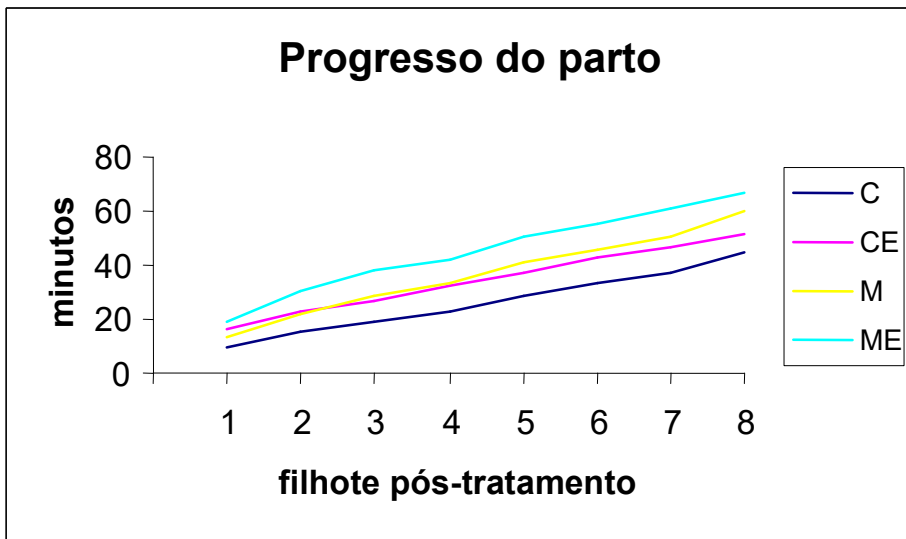


Figura 24: Progresso do parto (média). Efeito da microinjeção bilateral de salina ou muscimol na amígdala em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental durante o parto. ($F_{(3,22)} = 2,59$; $p = 0,08$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

- Número de filhotes nascidos em 30 minutos (figura 25):

A média de nascimentos em 30 minutos após a microinjeção nas ratas controle não estressadas foi de $5,1 \pm 0,6$ filhotes.

O estresse sócio-ambiental não interferiu no nascimento dos filhotes (C: $5,11 \pm 0,62$; CE: $3,42 \pm 0,77$ filhotes). E a administração de muscimol na amígdala logo após o nascimento do 3º filhote não alterou a média dos nascimentos (C: $5,11 \pm 0,62$; M: $3,75 \pm 0,87$ filhotes).

Entretanto houve uma diferença estatística no número de filhotes nascidos 30 min após a microinjeção entre os grupos controle não estresse e muscimol estresse ($p = 0,01$), onde as ratas do grupo controle não estresse tiveram uma média de $5,11 \pm 0,62$ filhotes e as ratas do grupo muscimol estresse tiveram uma média de $2,37 \pm 0,6$ filhotes ($F_{(3,28)} = 2,92$; $p = 0,05$).

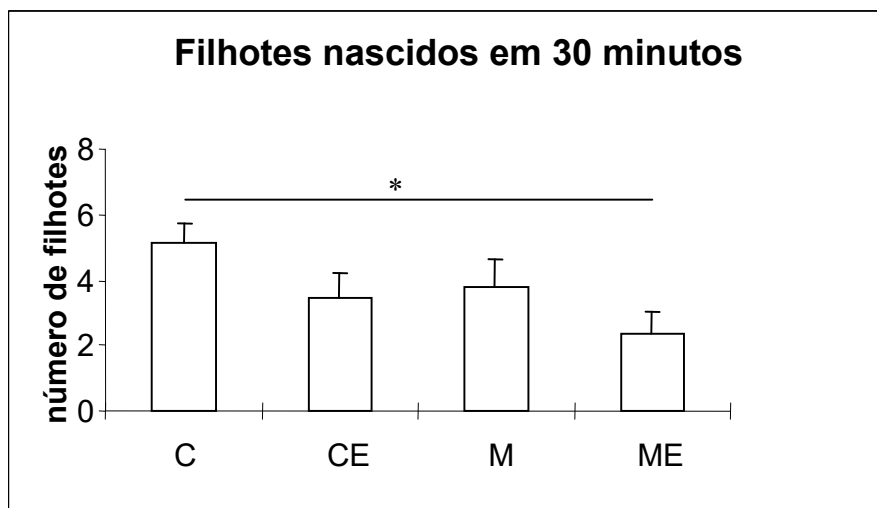


Figura 25: Número de filhotes nascidos 30 minutos (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção bilateral de salina ou muscimol na amígdala em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental durante o parto. * diferença entre as barras indicada pelas extremidades das linhas horizontais ($F_{(3,28)} = 2,92$; $p = 0,05$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

- Recuperação dos filhotes 24 h pós-parto (figura 26):

As ratas do grupo controle não estresse demoraram $13,7 \pm 5,2$ min para recuperar os 8 filhotes. O estresse durante o parto não interferiu no tempo de recuperação dos filhotes 24 h pós-parto (C: $13,7 \pm 5,2$; CE: $4,8 \pm 2,7$ min); o tratamento com muscimol no momento do parto não influenciou na recuperação dos 8 filhotes 24 h pós-parto (C: $13,7 \pm 5,2$; M $9,1 \pm 8,0$ min). Desta forma não foi observada diferença estatística entre tratamentos nos grupos analisados ($F_{(3,15)} = 0,85$; $p = 0,49$).

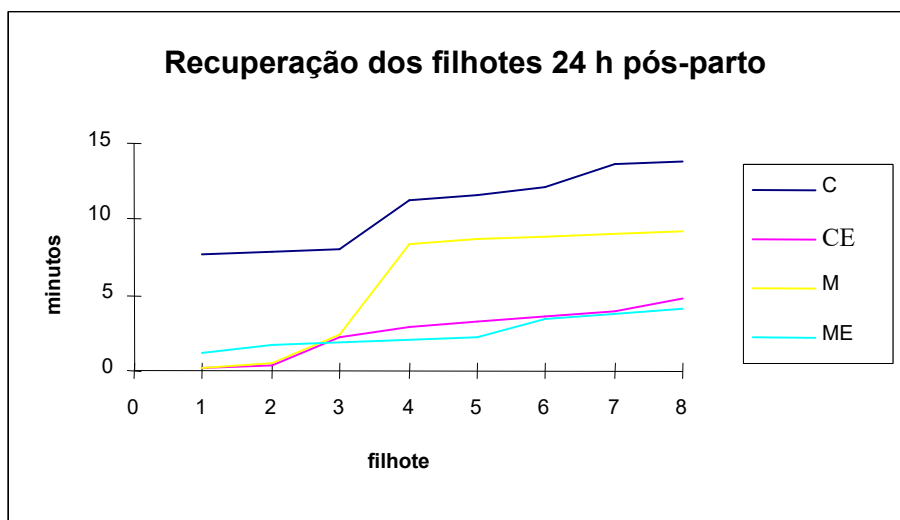


Figura 26: Recuperação dos filhotes 24 h pós-parto (média). Efeito da microinjeção bilateral de salina ou muscimol na amígdala em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental durante o parto. ($F_{(3,15)} = 0,85$; $p = 0,49$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

- Latência para o início da amamentação 24 h pós-parto (figura 27):

As ratas controle não estresse demoraram $19,2 \pm 3,5$ min para iniciar a amamentação 24 h após o parto.

Entre tratamentos não foi verificada diferença estatística entre os grupos observados ($H_{(3,19)} = 0,25$; $p = 0,96$); o tempo para iniciar a amamentação 24 h pós-parto não foi afetado pelo estresse, a latência para o início amamentação dos animais controle não foi diferente estatisticamente (C: $19,2 \pm 3,5$; CE: $20,2 \pm 3,9$ min). E o tratamento com muscimol, não causou nenhum efeito sobre a latência para o início da amamentação (C: $19,2 \pm 3,5$; M: $17,6 \pm 6,2$ min).

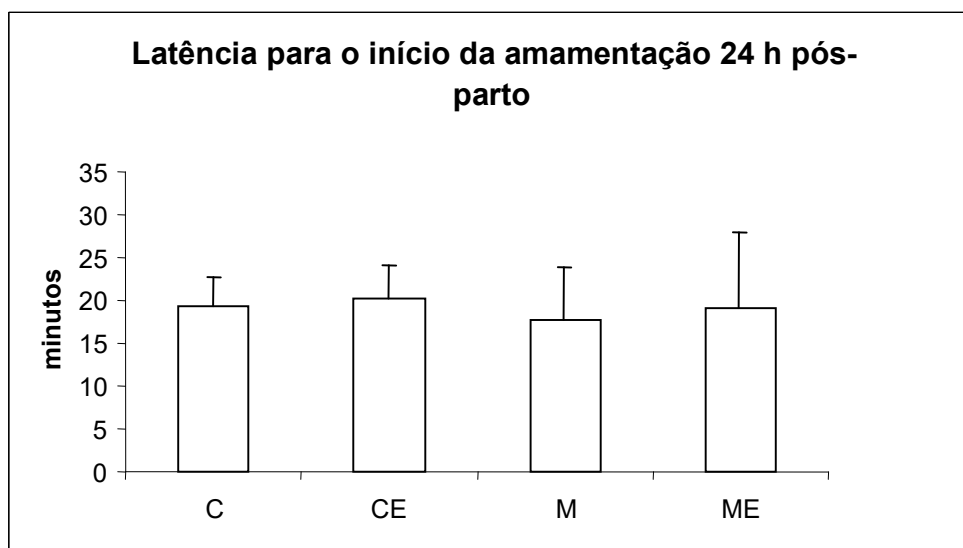


Figura 27: Latência para o início da amamentação 24 h pós-parto (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção bilateral de salina ou muscimol na amígdala em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental durante o parto. ($H_{(3,19)} = 0,25$; $p = 0,96$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

- Tempo em postura de amamentação 24 h pós-parto (figura 28):

O tempo em postura de amamentação para as ratas controle não estressadas foi de $8,1 \pm 2,6$ min na 1ª etapa e $18,1 \pm 3,3$ min na 2ª etapa.

O estresse durante o parto ou o tratamento com muscimol não interferiram no tempo despendido para a amamentação durante as 2 etapas de observação (1ª etapa: $H_{(3,19)} = 0,44$ e $p = 0,93$; 2ª etapa: $H_{(3,19)} = 2,18$ e $p = 0,53$).

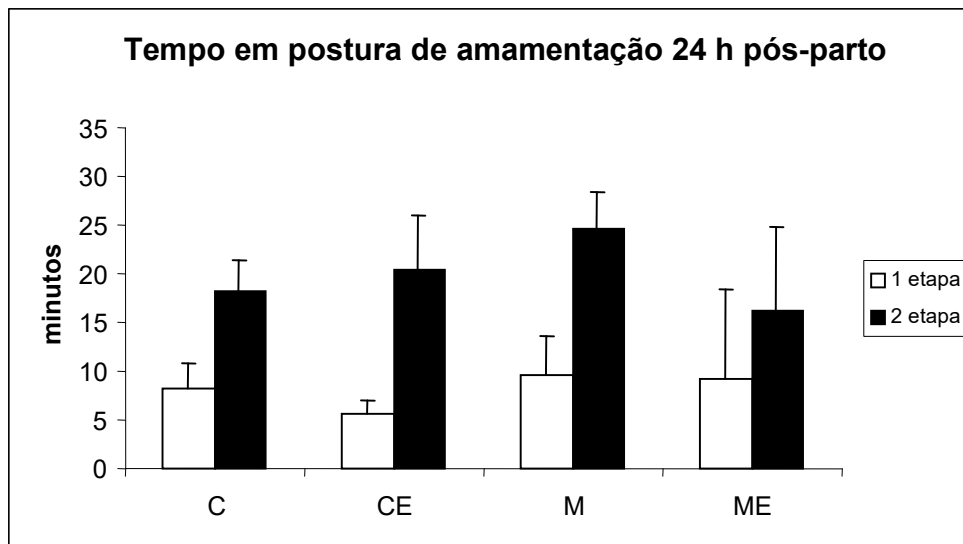


Figura 28: Tempo em postura de amamentação 24 h pós-parto (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção bilateral de salina ou muscimol na amígdala durante o parto de ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. (1ª etapa: $H_{(3,19)} = 0,44$ e $p = 0,93$; 2ª etapa: $H_{(3,19)} = 2,18$ e $p = 0,53$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

- Tempo maternal 24 h pós-parto (figura 29):

O tempo maternal 24 h pós-parto não foi diferente entre etapas para o grupo controle não estresse (1ª etapa: $8,4 \pm 1,5$; 2ª etapa: $5,9 \pm 1,4$ min).

Entre os grupos controle não foi observada diferença estatística, o estresse durante o parto não afetou o tempo maternal 24 h pós-parto em nenhuma das 2 etapas (C 1ª etapa: $8,4 \pm 1,5$; C 2ª etapa: $5,9 \pm 1,4$; CE 1ª etapa: $11,0 \pm 2,3$; CE 2ª etapa: $5,3 \pm 1,0$ min). O tratamento com muscimol no momento do parto, não alterou o tempo registrado em atividades maternas 1 dia após o parto (M 1ª etapa: $8,7 \pm 2,3$; M 2ª etapa: $1,7 \pm 1,0$; ME 1ª etapa: $11,7 \pm 4,8$; ME 2ª etapa: $11,3 \pm 7,0$ min). Desta forma, durante as 2 etapas da observação, não houve diferença estatística entre os tratamentos pelos quais os animais foram submetidos (1ª etapa: $H_{(3,19)} = 1,08$ e $p = 0,77$; 2ª etapa: $H_{(3,19)} = 4,04$ e $p = 0,25$).

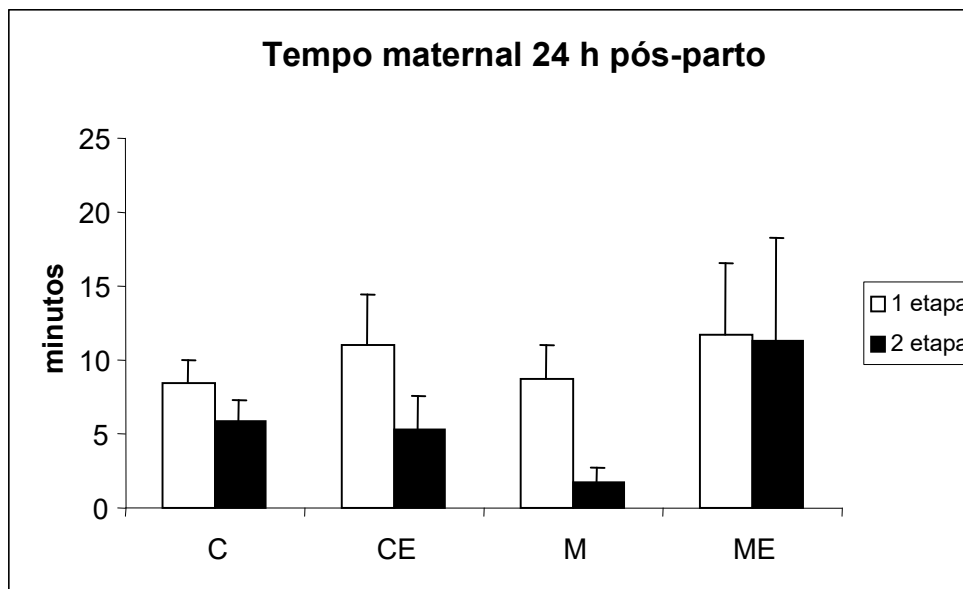


Figura 29: Tempo maternal 24 h pós-parto (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção bilateral de salina ou muscimol na amígdala durante o parto de ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. (1ª etapa: $H_{(3,19)} = 1,08$ e $p = 0,77$; 2ª etapa: $H_{(3,19)} = 4,04$ e $p = 0,25$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

- Tempo não maternal 24 h pós-parto (figura 30):

Não foi observada diferença estatística entre as etapas no tempo não maternal, para o grupo controle não estresse, que permaneceu $14,0 \pm 3,5$ min na 1ª etapa e $6,5 \pm 2,7$ min na 2ª etapa em atividades não maternais.

A situação de estresse sócio-ambiental durante o parto não interferiu no tempo não maternal 24 h pós-parto em nenhuma das 2 etapas (C 1ª etapa: $14,0 \pm 3,5$; C 2ª etapa: $6,5 \pm 2,7$; CE 1ª etapa: $14,1 \pm 4,3$; CE 2ª etapa: $5,0 \pm 3,6$ min). E a administração de muscimol logo após o nascimento do 3º filhote também alterou o tempo não maternal 24 h pós-parto durante as 2 etapas da observação (C 1ª etapa: $14,0 \pm 3,5$; C 2ª etapa: $6,5 \pm 2,7$; M 1ª etapa: $12,4 \pm 2,8$; M 2ª etapa: $4,0 \pm 3,4$ min). Portanto, os tratamentos (droga / situação sócio-ambiental) não causaram diferenças significativas durante as etapas de observação (1ª etapa: $H_{(3,19)} = 0,38$ e $p = 0,94$; 2ª etapa: $H_{(3,19)} = 1,58$ e $p = 0,66$).

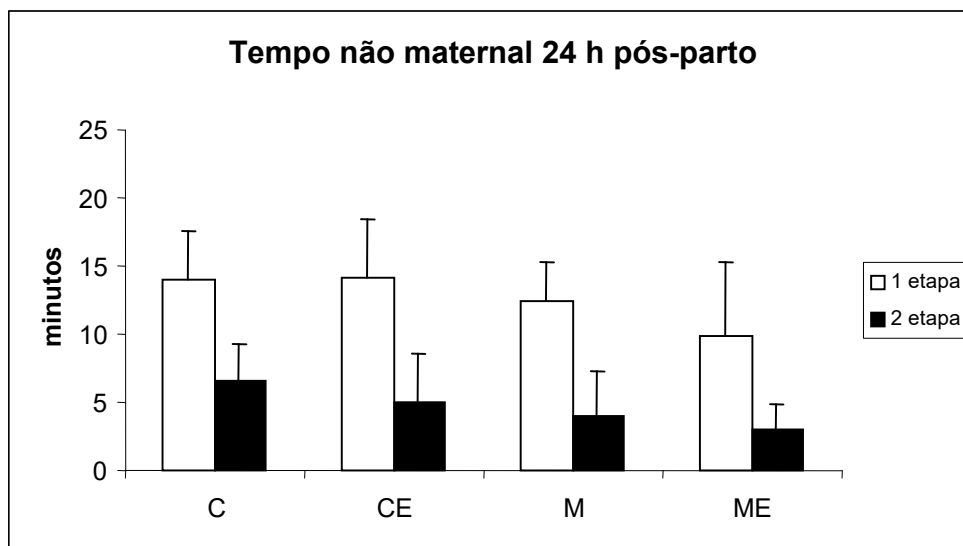


Figura 30: Tempo não maternal 24 h pós-parto (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção bilateral de salina ou muscimol na amígdala durante o parto de ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. (1ª etapa: $H_{(3,19)} = 0,38$ e $p = 0,94$; 2ª etapa: $H_{(3,19)} = 1,58$ e $p = 0,66$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

3.2) Efeito da microinjeção bilateral de agonista GABA_a na amígdala no comportamento maternal e lactação

- Recuperação dos filhotes (figura 31):

A recuperação do 8º e último filhote do grupo controle não estresse foi aos 3,5±1,2 min do tempo total da 1ª etapa.

A recuperação dos filhotes sofreu alterações devido os tratamentos pelos quais os animais foram submetidos, apresentando diferença estatística entre os grupos ($F_{(3,26)} = 4,51$; $p = 0,01$).

O estresse interferiu na recuperação dos filhotes dos grupos controle, de forma que os animais estressados foram mais lentos na recuperação de seus filhotes ($p = 0,05$).

Dos animais tratados com muscimol, os não estressados foram os que recuperaram mais rapidamente seus filhotes (M: 2,5±0,9; ME: 13,4±5,3 min; $p=0,01$).

Foi observada uma diferença estatística entre a recuperação dos filhotes de ratas não estressadas do grupo controle e ratas estressadas tratadas com muscimol, que foram mais lentas na recuperação de seus filhotes ($p = 0,007$).

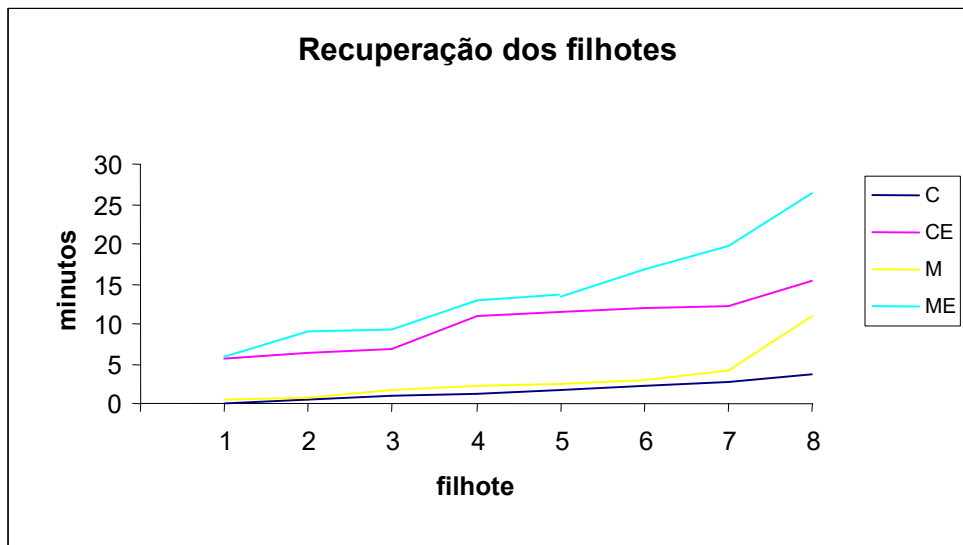


Figura 31: Recuperação dos filhotes (média). Efeito da microinjeção bilateral de salina ou muscimol na amígdala em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. ($F_{(7,53)} = 4,51$; $p = 0,01$; Duncan: C x CE, C x ME, M x ME, $p \leq 0,05$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

- Latência para o início da amamentação (figura 32):

A latência para o início da amamentação do grupo controle não estresse foi de $8,8 \pm 1,9$ min para 1ª etapa e de $8,4 \pm 2,7$ min para a 2ª etapa.

O estresse sócio-ambiental interferiu no tempo de início da amamentação durante a 2ª etapa, as ratas não estressadas do grupo controle demoraram mais para iniciar a amamentação ($8,4 \pm 2,7$ min) do que as ratas do grupo controle estresse ($2,7 \pm 0,5$ min; $p=0,003$). O tratamento com muscimol não causou diferença na latência para o início da amamentação durante as etapas do teste. Desta forma, apenas a situação de estresse foi capaz de alterar este comportamento maternal, entretanto, apenas durante a 2ª etapa do teste (1ª etapa: $H_{(3,30)} = 2,22$ e $p = 0,52$; 2ª etapa: $H_{(3,30)} = 12,60$ e $p = 0,005$).

Foi observada uma diferença estatística entre etapas no grupo controle estresse, onde as ratas demoraram mais para iniciar a amamentação durante a 1ª etapa quando comparado a 2ª etapa (1ª etapa: $9,3 \pm 1,5$; 2ª etapa: $2,7 \pm 0,5$ min; $p = 0,001$).

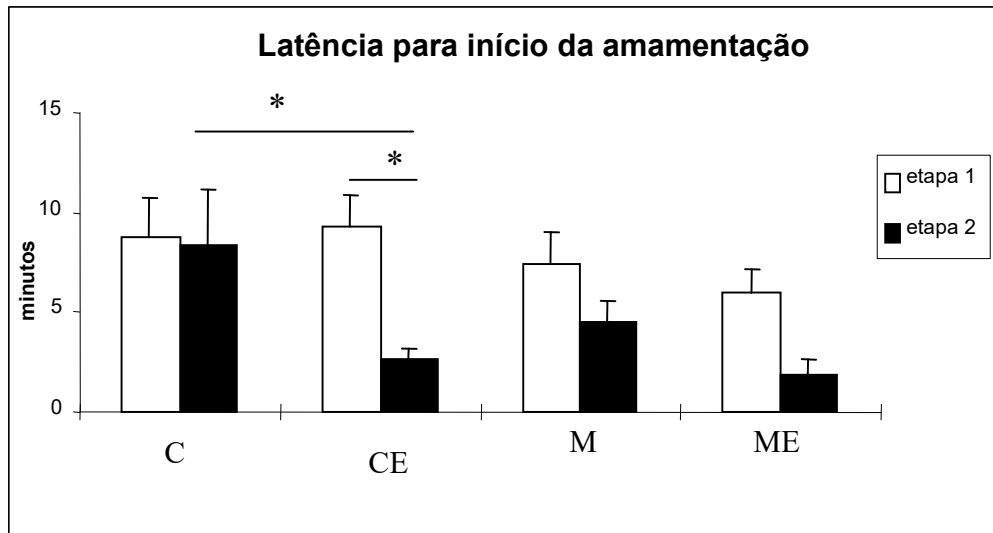


Figura 32: Latência para o início da amamentação (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou muscimol na amígdala em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental.* diferença entre as barras indicada pelas extremidades das linhas horizontais ($H_{(3,30)} = 12,60$ e $p = 0,005$; Mann-Whitney: CE1ª etapa x CE2ª etapa, $p = 0,001$). Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

- Tempo de construção do ninho (figura 33):

O grupo controle não estresse teve $0,5 \pm 0,3$ min em tempo de construção do ninho durante a 1ª etapa e $1,6 \pm 0,5$ min durante a 2ª etapa do teste.

O estresse interferiu no tempo de construção do ninho durante a 2ª etapa do teste ($p = 0,02$), onde os animais controle não estressados permaneceram mais tempo manipulando material para a construção do ninho ($1,6 \pm 0,5$ min) do que os animais controle estressados ($0,1 \pm 0,1$ min; $H_{(3,30)} = 8,22$; $p = 0,04$).

O tratamento com muscimol associado à situação de estresse diminuiu o tempo em atividade de construção do ninho durante a 2ª etapa do teste quando comparado ao grupo controle não estresse (C: $1,6 \pm 0,5$; ME: $0,5 \pm 0,2$ min; $p = 0,03$).

Assim sendo, os tratamentos pelos quais os grupos foram expostos, causaram diferença no tempo de construção do ninho durante a 2ª etapa do teste (1ª etapa: $H_{(3,30)} = 3,38$ e $p = 0,33$; 2ª etapa: $H_{(3,30)} = 8,22$ e $p = 0,04$).

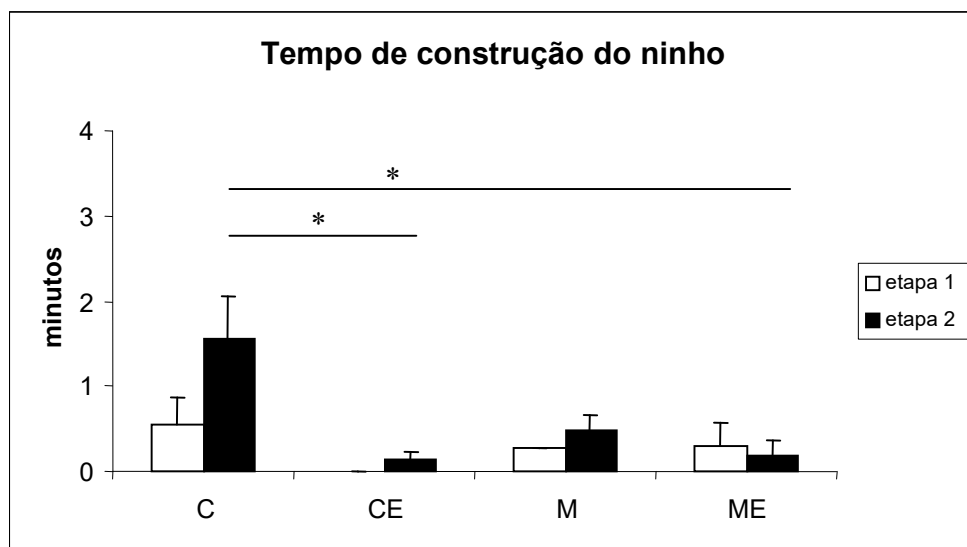


Figura 33: Tempo de construção do ninho (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou muscimol na amígdala em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. * diferença entre as barras indicada pelas extremidades das linhas horizontais ($H_{(3,30)} = 8,22$ e $p = 0,04$). Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

- Tempo maternal (figura 34):

As ratas controle não estressadas permaneceram $8,0 \pm 1,5$ min em atividades maternas durante a 1ª etapa e $4,5 \pm 1,2$ min durante a 2ª etapa do teste.

Houve diferença estatística entre grupos, submetidos a tratamentos distintos, em ambas as etapas do teste (1ª etapa: $H_{(3,30)} = 11,05$ e $p = 0,01$; $H_{(3,30)} = 9,31$ e $p = 0,02$).

O tratamento com muscimol associado a estresse diminuiu o tempo em que as ratas permaneceram em atividades maternas, em ambas as etapas, quando comparadas às ratas do grupo controle não estresse (1ª etapa $p = 0,003$; 2ª etapa: $p = 0,01$).

A situação de estresse em animais tratados com muscimol tendeu a diminuir o tempo maternal durante a 1ª etapa do teste (M: $5,0 \pm 1,1$; ME: $2,4 \pm 0,8$ min; $p = 0,06$)

Houve uma tendência do tratamento com muscimol em ratas não estressadas diminuir o tempo despendido em atividades maternas durante a 2ª etapa do teste (C: $8,0 \pm 1,5$; M: $1,5 \pm 0,3$ min; $p = 0,06$). Muscimol em animais estressados tendeu a diminuir o tempo maternal durante a 1ª etapa do teste ($p = 0,06$).

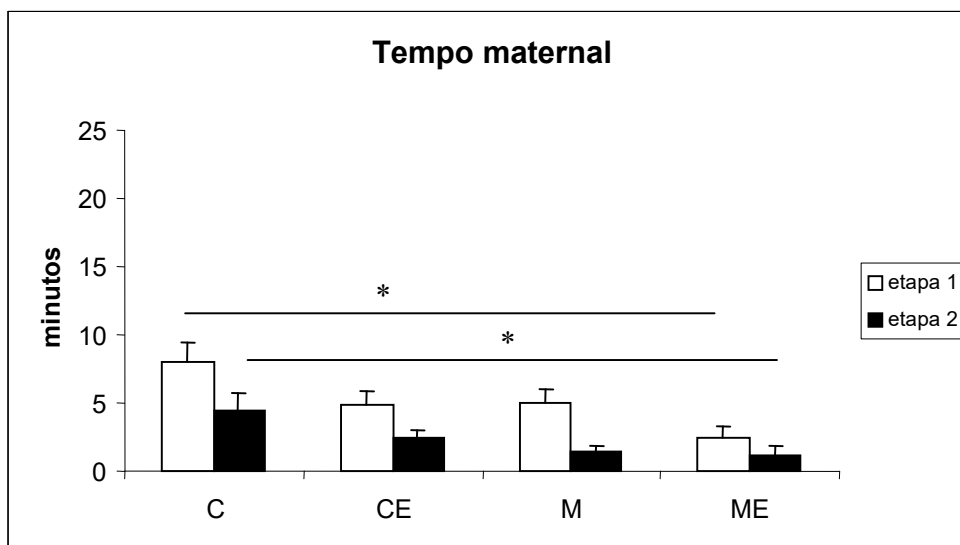


Figura 34: Tempo maternal (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou muscimol na amígdala em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. * diferença entre as barras indicada pelas extremidades das linhas horizontais (1ª etapa: $H_{(3,30)} = 11,05$ e $p = 0,01$; $H_{(3,30)} = 9,31$ e $p = 0,02$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

- Tempo não maternal (figura 35):

O grupo controle não estresse não apresentou diferença significativa no tempo não maternal entre as 2 etapas do teste (1ª etapa: $5,0 \pm 1,2$; 2ª etapa: $7,1 \pm 2,4$ min).

O estresse afetou o tempo não maternal das lactantes do grupo controle durante a 2ª etapa do teste ($H_{(3,30)} = 8,41$ e $p = 0,03$), onde as lactantes estressadas permaneceram menos tempo em atividades não maternais quando comparadas as não estressadas (C: $7,1 \pm 2,4$; CE: $1,9 \pm 0,3$ min; $p = 0,009$).

Também foi observada uma diferença entre o grupo controle estresse e o grupo muscimol não estresse durante a 2ª etapa do teste ($H_{(3,30)} = 8,41$; $p = 0,03$), ratas estressadas do grupo controle permaneceram menos tempo em atividades não maternais quando comparadas às ratas não estressadas tratadas com muscimol (CE: $1,9 \pm 0,3$; M: $4,9 \pm 1,1$ min; $p = 0,01$).

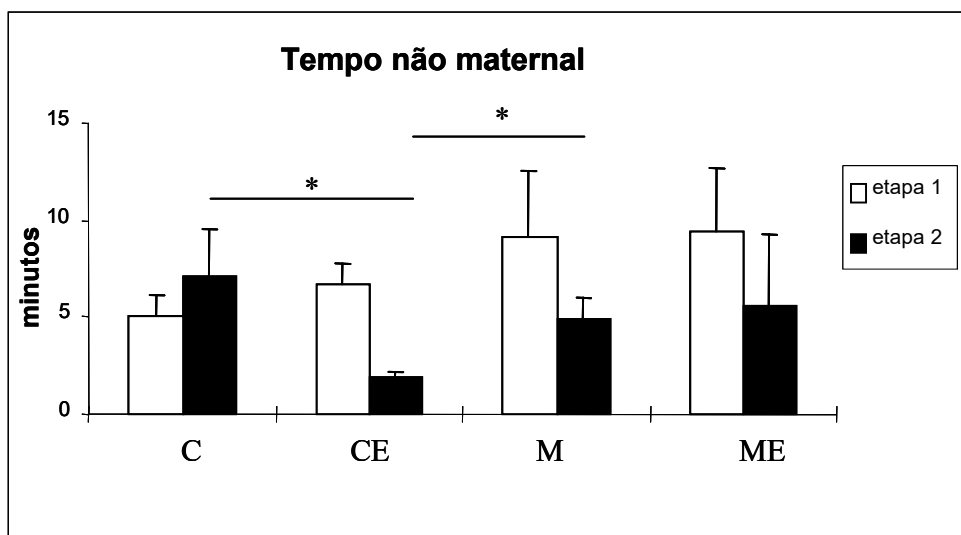


Figura 35: Tempo não maternal (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou muscimol na amígdala em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. ($H_{(3,30)} = 8,41$; $p = 0,03$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

- Tempo total (figura 36):

No tempo total necessário para completar os 15 minutos de amamentação não houve diferença estatística entre etapas para o grupo controle não estresse (1ª etapa: $27,4 \pm 2,2$; 2ª etapa: $26,2 \pm 3,4$ min). Entretanto, a situação de estresse alterou o tempo total durante a 2ª etapa do teste ($H_{(3,30)} = 8,23$; $p = 0,04$), fazendo com que o tempo total fosse menor para o grupo controle estresse ($19,2 \pm 0,7$ min) quando comparado ao grupo controle não estresse ($26,2 \pm 3,5$ min; $p = 0,007$).

Foi observada uma diferença significativa entre etapas no grupo controle estresse ($p = 0,001$), que teve o tempo total da 1ª etapa maior ($26,1 \pm 2,1$ min) do que o tempo total da 2ª etapa ($19,2 \pm 0,7$ min; $p = 0,001$).

A microinjeção de muscimol na amígdala não alterou o tempo total necessário para os 15 min de amamentação em nenhuma das etapas do teste (M 1ª etapa: $26,8 \pm 1,4$; M 2ª etapa: $21,2 \pm 1,4$; ME 1ª etapa: $24,7 \pm 1,6$; ME 2ª etapa: $19,7 \pm 2,0$ min).

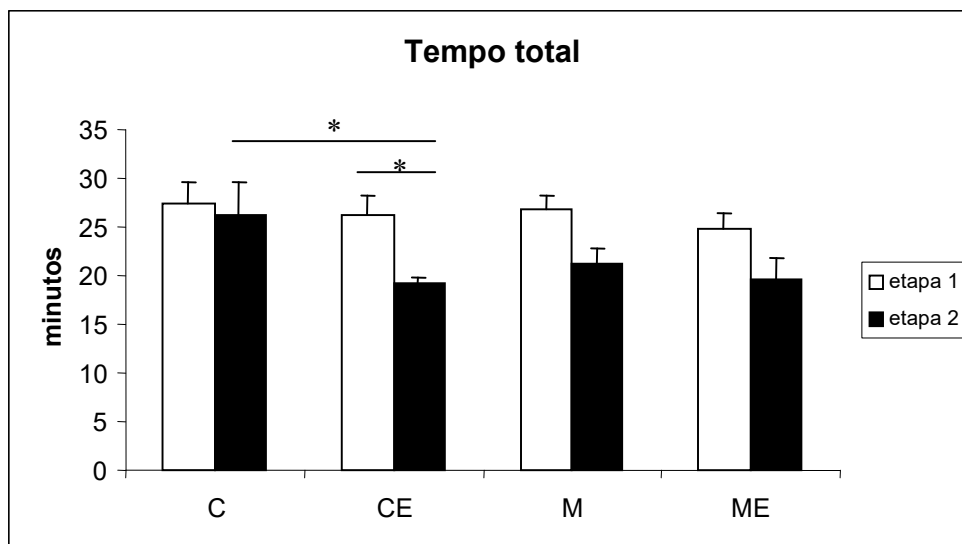


Figura 36: Tempo total necessário para completar 15 min de amamentação (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou muscimol na amígdala em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. * diferença entre as barras indicada pelas extremidades das linhas horizontais ($H_{(3,30)} = 8,23$; $p = 0,04$). Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

- Ganho de peso dos filhotes (figura 37):

O ganho de peso total dos filhotes do grupo controle não estresse foi de $3,3 \pm 1,1$ %; não houve diferença estatística entre o ganho peso por etapas, onde na 1ª etapa os filhotes ganharam $1,4 \pm 0,6$ % do peso inicial e na 2ª etapa $1,9 \pm 0,6$ % .

O estresse não influenciou no ganho de peso dos filhotes entre as etapas (C 1ª etapa: $1,4 \pm 0,6$; C 2ª etapa: $1,9 \pm 0,6$; CE 1ª etapa: $0,4 \pm 0,2$; CE 2ª etapa: $2,8 \pm 0,7$ %; $F_{(3,25)} = 3,13$; $p = 0,99$) ou no ganho de peso total (C: $3,3 \pm 1,1$ %; CE: $3,2 \pm 0,8$ %; $F_{(3,25)} = 0,03$; $p = 0,99$).

A ninhada do grupo controle estresse ganhou menos peso durante a 1ª etapa do teste ($0,4 \pm 0,2$ %) do que na 2ª etapa ($2,8 \pm 0,7$ %; $p = 0,006$).

A microinjeção de muscimol na amígdala não alterou o ganho de peso dos filhotes por etapa (C 1ª etapa: $1,4 \pm 0,6$; C 2ª etapa: $1,9 \pm 0,6$; M 1ª etapa: $1,6 \pm 0,7$; M 2ª etapa: $1,5 \pm 0,7$ %; $F_{(3,25)} = 3,13$; $p = 0,99$) ou total (C: $3,4 \pm 0,6$; M: $3,2 \pm 0,7$ %; $F_{(3,25)} = 0,03$; $p = 0,99$).

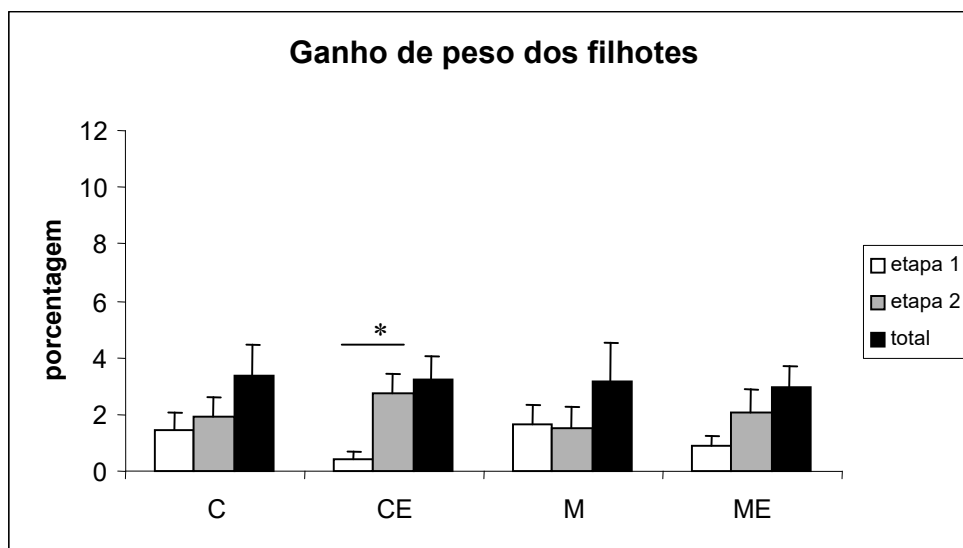


Figura 37: Ganho de peso dos filhotes (média + e.p.m.). Efeito da microinjeção de salina ou muscimol na amígdala em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. * diferença entre as barras indicada pelas extremidades das linhas horizontais (Mann-Whitney: $p = 0,006$). Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

- Modo de início da amamentação (figura 38):

Não houve diferença estatística no modo de início da amamentação entre as etapas para o grupo controle não estresse, a maioria das ratas foram ao encontro dos filhotes e então assumiam a postura de amamentação (modo de início 4).

A situação de estresse e o tratamento com muscimol não influenciaram a forma das ratas iniciarem a amamentação durante as 2 etapas (1ª etapa: $H_{(3,29)} = 5,49$ e $p = 0,13$; 2ª etapa: $H_{(3,29)} = 5,27$ e $p = 0,15$).

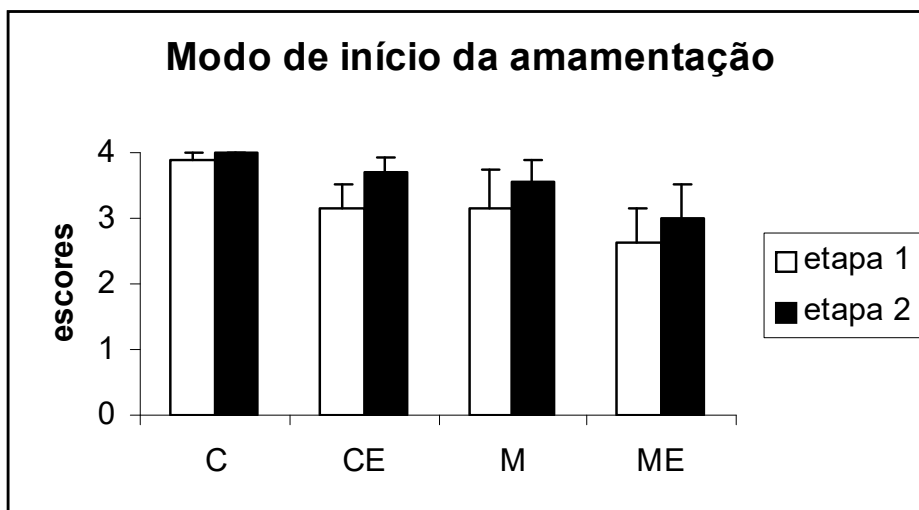


Figura 38: Modo de início da amamentação. Efeito da microinjeção de salina ou muscimol na amígdala em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. (1ª etapa: $H_{(3,29)} = 5,49$ e $p = 0,13$; 2ª etapa: $H_{(3,29)} = 5,27$ e $p = 0,15$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

- Filhotes no ninho (figura 39):

O número de filhotes no ninho a cada 5 minutos dos 30 minutos iniciais de cada etapa do teste, não foi diferente para o grupo controle não estresse durante as 2 etapas do teste.

Nem o estresse nem o tratamento com muscimol interferiram neste parâmetro em nenhum momento dos períodos analisados (1ª etapa: $H_{(3,30)} = 1,14$ e $p = 0,69$; 2ª etapa: $H_{(3,30)} = 5,01$ e $p = 0,17$).

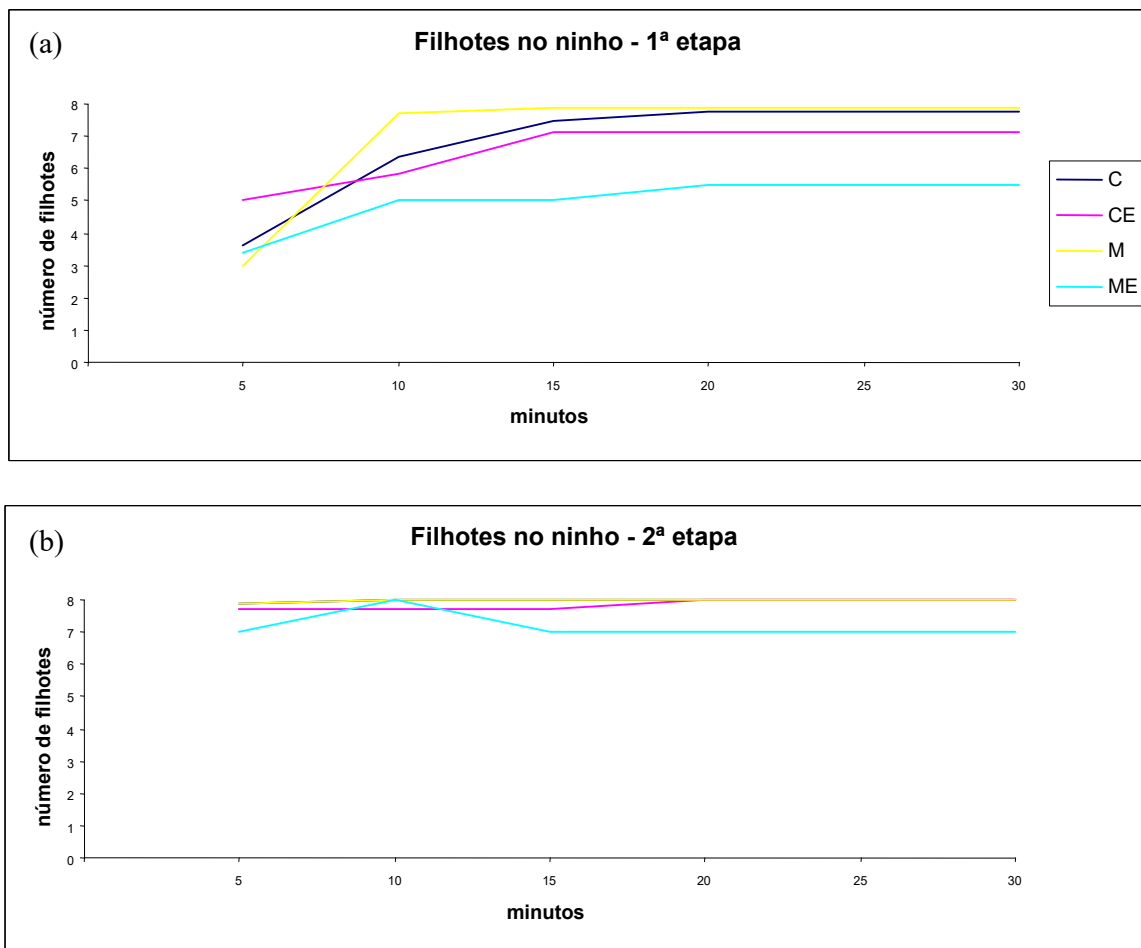


Figura 39: Filhotes no ninho (média). Efeito da microinjeção de salina ou muscimol na amígdala em ratas submetidas ou não a estresse sócio-ambiental. (1ª etapa: $H_{(3,30)} = 1,14$ e $p = 0,69$; 2ª etapa: $H_{(3,30)} = 5,01$ e $p = 0,17$) Controle não estresse (C), Controle estresse (CE), Muscimol não estresse (M), Muscimol estresse (ME).

DISCUSSÃO

Efeito da microinjeção de agonistas opióides nos núcleos da estria terminal (NET) no progresso do parto

O uso central de agonistas opióides nos NET não teve efeito sobre o parto. A microinjeção de agonista opióide μ (DAGO) ou κ (U-50488) nos NET das ratas parturientes, logo após o nascimento do 1º filhote não interrompeu o progresso do parto, não alterou a duração total nem os intervalos entre os nascimentos. Portanto, apesar dos NET facilitar a secreção de ocitocina durante a lactação (Ingram et al, 1995) e ser fortemente inibido por opióides ao final da gestação (Housham et al, 1995) a sua participação durante o parto não parece ser importante. Por outro lado, outros estudos demonstram que a administração de morfina (agonista opióide), intracerebroventricular (i.c.v.) ou periféricamente (i.p.), logo após o nascimento do 2º filhote interrompe o parto e produz uma inibição da secreção de ocitocina, prejudicando a expressão do comportamento maternal (Russell et al, 1989). O uso do agonista opióide κ U-50488 (i.p. ou intravenosamente, i.v.), logo após o nascimento do 2º filhote também atrasa o nascimento dos 4 filhotes pós-tratamento em aproximadamente 100 minutos e diminui a concentração de ocitocina plasmática, efeito que é totalmente revertido com o uso do antagonista opióide κ nor-binaltorfimina (i.v.); mostrando a atuação dos receptores opióides κ durante o parto (Douglas et al, 1993). A administração central de agonista opióide, no momento do parto, nos NET, parece não ter efeito sobre a secreção de ocitocina, ou seja, não ocorre uma atividade inibitória opióide neste núcleo que interfira no processo do parto. Possivelmente, a neurotransmissão opióide dos NET não está envolvida nos eventos que ocorrem durante o parto. Provavelmente, outras áreas cerebrais como a pré-óptica medial tenham uma maior

participação na modulação da atividade das vias opióides durante o parto. Ou então, o uso sistêmico de opióides seja mais potente, uma vez que U-50488 i.p. ou i.v. interfere no progresso normal do parto (Douglas et al, 1993).

Os animais controle foram mais sensíveis à manipulação (demonstrado pela ocorrência de diferença entre etapas, sendo que na 1ª etapa a rata foi manipulada brevemente na transferência para a caixa onde continha seus filhotes já espalhados enquanto que na 2ª etapa isto não ocorria), pois na 1ª etapa permaneceram menos tempo amamentando e mais tempo em atividades maternas, enquanto que na 2ª etapa mostraram comportamento contrário, amamentaram mais e passaram pouco tempo em atividades maternas. Nossos resultados diferem das observações de Lazzarotto et al (2001), que utilizando agonistas opióides (DAGO ou U-50488) nos NET para avaliar o comportamento maternal em ratas lactantes (7-13 dias pós-parto) encontraram um comprometimento deste comportamento nas ratas tratadas com DAGO (agonista opióide μ), que tenderam a demorar mais para recolher seus filhotes, sendo que algumas vezes nem os recolheram (eles iam ao encontro da mãe), a amamentação era interrompida para realizar atividades não maternas e seus filhotes ganharam menos peso durante a 1ª etapa do teste ; o uso do agonista U-50488 tendeu acelerar o recolhimento dos filhotes e todas as ratas recolheram seus filhotes, a amamentação, se interrompida, era apenas para melhoria do ninho ou cuidados com os filhotes, que tiveram um aumento de peso significativo. Nosso estudo apresentou uma diferença no comportamento entre os grupos U-50488 e DAGO no período 24 h após o parto, onde o grupo tratado com U-50488 apresentou um prejuízo na atividade maternal (maior latência para início da amamentação) comparado com o grupo tratado com DAGO. Já o estudo de Lazzarotto et al (2001) (realizado em nosso laboratório) indica que no período de lactação o agonista DAGO nos NET prejudica a expressão do

comportamento maternal, ou seja, há uma ação inibitória opióide mediada por receptores μ e que o agonista U-50488 nos NET pode ter um papel auxiliador ou de reforço na expressão do comportamento maternal. Com isto, pode-se sugerir que haja participação dos receptores κ dos NET na expressão do comportamento maternal durante o período de lactação, mas que estes possam talvez prejudicar esta expressão 24 h pós-parto, embora juntamente com os receptores μ pareçam modular o comportamento maternal das ratas tratadas, uma vez que ambos diminuíram a sensibilidade do animal à manipulação.

Efeito da microinjeção de antagonistas opióides nos núcleos da estria terminal (NET) em ratas parturientes e lactantes submetidas a estresse

Em nosso modelo experimental, o estresse não interferiu no progresso do parto e no intervalo entre os nascimentos. Naltrexona (antagonista opióide não seletivo) nos NET, administrada logo após o nascimento do 3º filhote também não teve influência sobre o parto. Em situações de distúrbio ambiental (estresse) há um aumento no tempo de duração do parto em ratas (Leng et al, 1985); em situações ambientais familiares, o uso de naloxona (antagonista opióide não seletivo) subcutaneamente faz com que o intervalo entre os nascimentos seja reduzido no parto de ratas, porém, em situação de estresse ambiental o uso deste antagonista opióide subcutaneamente não altera o tempo de duração do parto (Leng et al, 1985). Por outro lado, em estudos posteriores (Leng et al, 1988), a administração endovenosa de naloxona em animais estressados e não estressados diminuiu a duração do parto. Acreditávamos que o uso de naltrexona (antagonista opióide não seletivo) em um dos sítios de atuação opióide envolvidos com a liberação de ocitocina (no caso, NET) pudesse

inibir os efeitos do estresse. Entretanto, ratas expostas a estresse sócio-ambiental durante o parto e/ ou tratadas com naltrexona nos NET, logo após o nascimento do 3º filhote, não tiveram o parto interrompido e nem o tempo de duração total do parto ou o intervalo entre os nascimentos alterados. Neumann et al (1993) verificaram que naloxona administrada logo após o nascimento do 2º filhote no núcleo supra-óptico (SON) não interfere no tempo de duração do parto, já no núcleo paraventricular (PVN) faz com que haja uma melhora do tempo entre o nascimento do 4º e 7º filhote comparado com o grupo tratado com naloxona no SON. Provavelmente, as vias modulatórias dos NET na secreção de ocitocina não sejam ativadas durante o processo do parto, devido a alta resistência pré-existente ocasionada pelas adaptações naturais do organismo (aumento de β -endorfina e diminuição da atividade do eixo HPA) que ocorrem no período de gestação, tornando desta forma estes mecanismos neuroendócrinos menos suscetíveis aos distúrbios no momento do parto. Eventos relacionados com o trabalho de parto (por exemplo a dor) fazem com que vias opióides endógenas inibam a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) no momento do parto em ratas (Wigger et al, 1999), tornando a gestante mais resistente às perturbações do meio. Também há um aumento de β -endorfina (opióide endógeno), observado a partir do 8º dia de gestação, que promove uma adaptação da mãe à sua nova situação (prenhez); e este alto tônus opióide persiste até aproximadamente 1 semana após o parto (Wardlaw e Frantz, 1983).

No período de lactação (7-8 dias pós-parto) o estresse não interferiu no comportamento maternal das ratas. Apesar de haver uma atenuação nas respostas ao estresse (Mezzacapa et al, 2003), em ratas lactantes é observada uma ativação do eixo HPA em situação de conflito social (Neumann et al, 2001). Em nosso estudo, ao utilizarmos o ambiente novo e a introdução de um macho a este ambiente (separado da lactante e da

ninhada por uma caixa isoladora), as ratas lactantes parecem não terem sido afetadas pela situação estressora, não apresentando alteração na expressão do comportamento.

O uso de antagonista opióide tem sido descrito como uma ferramenta para reverter os efeitos do estresse sobre o comportamento maternal (Leng et al, 1988). Naloxona usada no início da lactação (5-7 dias pós-parto), sistêmica ou centralmente, resulta em um prolongamento nos cuidados com os filhotes e com o ninho (Byrnes et al, 2000). Em nosso estudo, este efeito dos antagonistas opióides foi observado, apenas em ratas tratadas com nor-binaltorfimina. Em ratas estressadas, o tratamento com nor-binaltorfimina diminuiu o tempo não maternal durante a 2ª etapa do teste, sugerindo que o antagonismo dos receptores κ em situações de estresse facilite a expressão do comportamento maternal da lactante.

O uso de antagonista opióide κ ou μ nos NET das ratas não estressadas teve o efeito esperado nas situações de estresse, ou seja, a microinjeção de antagonista opióide seletivo nos NET diminuiu o tempo em que as ratas permaneceram em atividades não maternais. Este efeito contraditório dos antagonistas opióides observado em nosso estudo nas ratas não submetidas a estresse sugere que nossos animais sejam mais resistentes ao meio. Os animais tratados com nor-binaltorfimina ou com naloxonazina mostraram-se sensíveis ao estresse, pois demoraram mais na 1ª etapa para completar os 15 minutos de amamentação do que na 2ª etapa. Ratas tratadas com naltrexona e com naloxonazina não estressadas apresentaram uma certa sensibilidade mesmo não sendo expostas a ambientes com distúrbios, pois as ratas tratadas com naltrexona permaneceram mais tempo em atividades maternais durante a 1ª etapa do teste, ou seja, logo após a manipulação necessária realizada momentos antes do teste para a microinjeção e acomodação da ratas na caixa, e as tratadas

com naloxonazina demoraram mais tempo na 1ª etapa do que na 2ª para completar os 15 minutos de amamentação. Esta sensibilidade observada em relação a diferença entre etapas nos grupos BE, NZE, N e NZ, sugere uma certa variação adaptativa pré-existente entre os animais, apesar de todos serem mantidos em condições semelhantes.

O comportamento maternal é vital para os filhotes, pois é através da expressão dele que os filhotes irão obter alimentação e cuidados necessários para sua sobrevivência até adquirirem independência. O estabelecimento inicial normal e a manutenção do comportamento maternal em ratos pode ser regulada por opióides endógenos (Bridges e Grimm, 1982). Nos ratos este comportamento maternal é mediado através de reflexos neuroendócrinos, que podem ser estimulados ou inibidos pela situação sócio-ambiental na qual a lactante e a ninhada se encontram. O estresse inibe o reflexo de ejeção de leite por liberação de opióides endógenos (Wakerley et al, 1995). Opióides administrados experimentalmente, inibem o comportamento maternal em ratas lactantes (Bridges e Grimm, 1982). O tratamento com morfina durante a gravidez em ratas inibe o comportamento maternal no período de lactação (Stafissio-Sandoz et al, 1998, Miranda-Paiva et al, 2001, Slamberová et al, 2001) e esta inibição está associada a uma relativa inativação induzida por opióides de áreas envolvidas com a regulação do comportamento maternal (Stafissio-Sandoz et al, 1998). Porém, com o nosso modelo de estresse associado a microinjeção do antagonista opióide κ (nor-binaltorfimina), podemos sugerir a participação dos receptores κ na modulação do comportamento maternal no período de lactação, uma vez que este antagonista reverteu parte do comportamento maternal (tempo não maternal) que apresentou prejuízo em situação de estresse.

Efeito da microinjeção de agonista GABA_a na amígdala em ratas parturientes e lactantes submetidas a estresse

Com o uso de muscimol (agonista GABA_a) na amígdala tentamos bloquear a ação do estresse sobre a amígdala. Porém, em situação de distúrbio ambiental, a administração bilateral deste agonista GABA_a, logo após o nascimento do 3º filhote não interferiu no tempo de duração do parto. Segundo Gray (1993), situação de estresse ativa a amígdala, que possui vias encefalinérgicas inibitórias para os NET (Uhl et al., 1978; Sawada e Yamamoto, 1981; Rao et al, 1987) e que desta forma pode deprimir os reflexos neuroendócrinos responsáveis pelo comportamento maternal, em especial a liberação de ocitocina. Sabe-se que o aumento da neurotransmissão GABAérgica na amígdala bloqueia a aquisição e a expressão do medo condicionado (Jasnow e Huhman, 2001). E que a infusão de agonista GABA na amígdala produz efeitos ansiolíticos no teste de conflito social (Sanders e Shekhar, 1995). Também é observado um aumento da função do receptor GABA_a no córtex cerebral e no hipocampo (áreas fortemente conectadas à amígdala; de Olmos et al, 1985) de ratas no momento do parto (Follesa et al, 1998). Então, a administração de muscimol na amígdala (agonista GABA_a) durante o parto em situações de distúrbios ambientais poderia eliminar os efeitos do estresse através de uma ação ansiolítica. Porém, o uso de muscimol no momento do parto não teve o efeito esperado em nosso estudo. No momento do parto, a neurotransmissão GABAérgica da amígdala parece não auxiliar na prevenção dos possíveis efeitos estressores sobre as vias encefalinérgicas da amígdala para os NET.

Tanto a situação de estresse sócio-ambiental quanto o tratamento com muscimol na amígdala das lactantes não causou alteração no comportamento maternal observado 1 dia

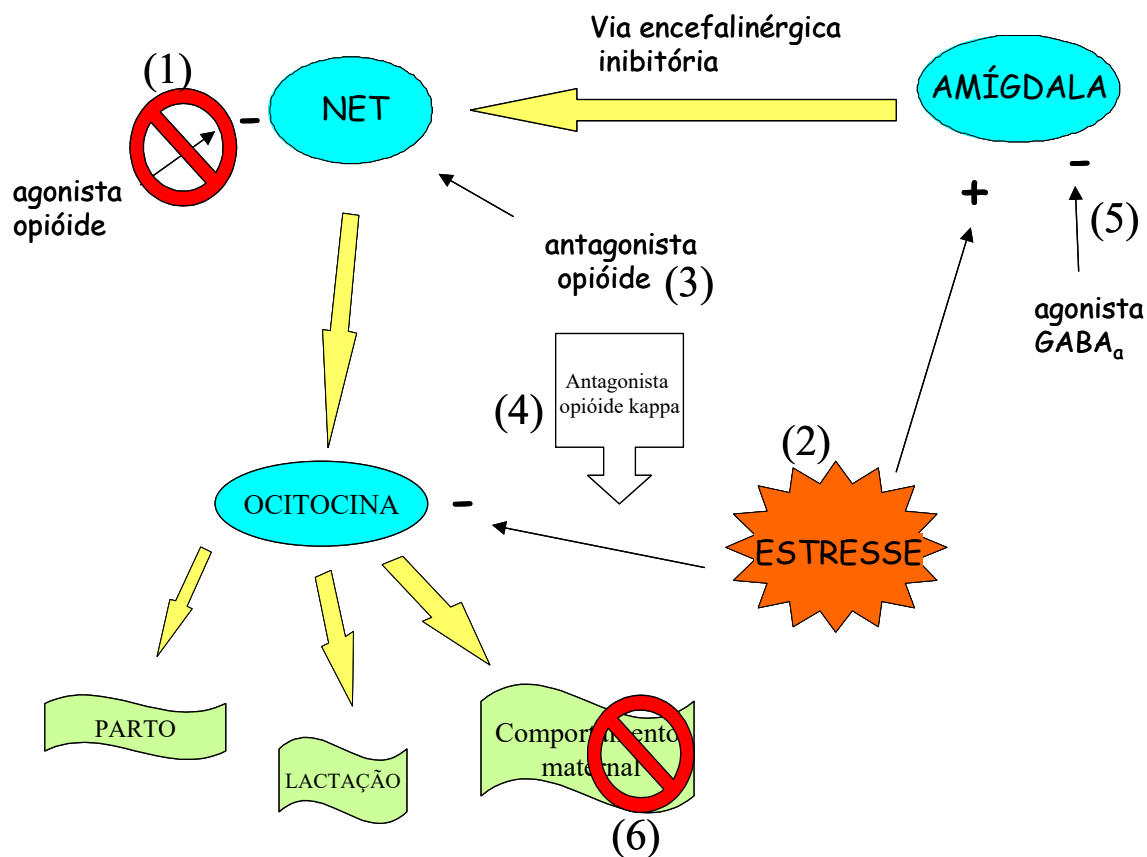
após o parto. Sugerindo a amígdala não faça parte do circuito neural responsável pela consolidação e expressão do comportamento maternal um dia após o parto, uma vez que a ativação da amígdala no momento do parto devido uma situação de distúrbio ambiental não influenciou no desempenho da lactante com relação à prole, bem como sua inibição através da microinjeção de muscimol.

Ratas lactantes (7-8 dias pós-parto) submetidas a estresse tiveram um comprometimento na expressão do comportamento maternal. Animais controle submetidos a estresse sócio-ambiental demoram mais para recuperar seus filhotes. Entretanto, a latência para o início da amamentação, na 2ª etapa do teste, foi menor, mostrando que as lactantes estressadas foram mais ágeis para iniciar a amamentação logo após o primeiro contato com o estímulo estressor. Estes animais aparentemente mostraram-se mais resistentes aos efeitos do estresse durante a 2ª etapa do teste, pois permaneceram menos tempo construindo ninho, permaneceram menos tempo em atividades não maternais e concluíram os 15 minutos de amamentação em um menor tempo. As ratas do grupo controle estresse mostraram-se mais afetadas pelo estresse durante a 1ª etapa do teste onde seus filhotes ganharam menos peso, as lactantes demoraram mais para iniciar a amamentação e para completar os 15 minutos de amamentação. O estresse em ratas tratadas com muscimol prejudicou a recuperação dos filhotes.

Eventos ambientais podem interferir no comportamento maternal. O estresse é um exemplo, onde em ambientes não familiares pode ser verificada uma interferência no comportamento maternal (Leng et al, 1987). Em nosso estudo, o estresse interferiu no comportamento maternal durante o período de lactação, a mudança de ambiente associada à presença de um intruso (macho) fez com que as mães apresentassem uma alteração na expressão de alguns comportamentos maternais (recuperação dos filhotes, latência para

início da amamentação, tempo de construção do ninho, tempo não maternal e tempo total para completar 15 minutos de amamentação). A administração de muscimol nas amígdalas não teve o efeito esperado, ao contrário prejudicou o comportamento maternal quando associado a situação de estresse, demonstrando que apesar de aparentemente a amígdala ter sido ativada pelo estresse, a modulação do comportamento maternal provavelmente nada tenha a ver com as vias opióides da amígdala para os NET ou então que a neurotransmissão GABAérgica não tenha influência na modulação do comportamento maternal em situações de distúrbios sócio-ambientais durante o período de lactação.

CONCLUSÃO



Neste trabalho, concluímos que a neurotransmissão opióide nos NET não interfere no parto (1), entretanto, a ativação dos receptores κ no momento do parto prejudica a expressão do comportamento materno 24 após o parto.

Em nosso modelo experimental, a situação de estresse (2) ou o tratamento com naltrexona (3) não prejudica o progresso do parto nem a expressão do comportamento materno um dia após o parto.

Por outro lado, verificamos que a administração de um antagonista opióide κ nos NET auxilia a expressão do comportamento materno de lactantes estressadas (4).

A microinjeção de um agonista GABA_A (muscimol) na amígdala no momento do parto (5) não produz nenhum efeito sobre o intervalo entre os nascimentos dos filhotes, bem como sobre o comportamento maternal 24 h após o parto. Em ratas lactantes estressadas, muscimol na amígdala produziu efeito deletério sobre o comportamento maternal (6).

Em conclusão, a ativação de receptores opióides nos NET ou o modelo de estresse utilizado nestes estudos não interferem com o progresso do parto. No entanto, a ativação dos receptores κ indicou uma alteração do comportamento maternal no dia seguinte. Seria interessante verificar por quanto tempo as lactantes que receberam agonista κ nos NET continuariam demonstrando déficits e se este efeito é prejudicial ao desenvolvimento da ninhada. Outra sugestão seria testar se o efeito do estresse durante o parto poderia ser bloqueado pela microinjeção de antagonistas κ nos NET. Em ratas lactantes, curiosamente, a microinjeção de agonista μ (mas não κ) nos NET prejudicou o comportamento maternal (Lazarotto et al, 2001). Nós mostramos neste trabalho que o estresse também teve efeito semelhante, porém contrário ao que seria de se esperar, este não foi revertido por antagonista opióide μ nos NET, e sim por antagonista κ .

Quanto à participação da amígdala, nossos estudos indicam um papel duplo do complexo amigdalóide nos efeitos do estresse. Esta estrutura seria recrutada durante o parto do animal estressado para inibir o comportamento maternal a longo prazo, enquanto que na lactante, o efeito do estresse não depende desta área encefálica. Portanto, o mesmo estresse aplicado durante o parto ou durante a lactação estaria ativando circuitos neurais distintos, no primeiro caso, a amígdala seria importante facilitador, enquanto que no segundo, esta

não seria recrutada, ou mesmo estaria se opondo aos efeitos do estresse sobre o comportamento maternal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, Z. B.; GRATTAN, D. Opioid control of prolactin secretion in late pregnant rats is mediated by tuberoinfundibular dopamine neurons. **Neuroscience Letters**, v. 328, p. 60-64, 2002.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; FAVARETTO, A. L. V. Sistema Reprodutor. In: AIRES, M. M. (org.). **Fisiologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

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

BRODNAR, R.J.; GLASS, M.J.; RAGNAUTH, A.; COOPER, M.L. General μ and κ opioid antagonists in the nucleus accumbens alter food intake deprivation, glucoprivic and palatable conditions. **Brain research**, v. 700, nº1-2, p. 205-212, 1995.

BROWN, R. E. Hormônios e comportamento parental. In: Costa, M. J. R. P.; Cromberg, V. U. (ed.) **Comportamento Materno em Mamíferos (Bases teóricas e Aplicações aos Ruminantes Domésticos)**. Sociedade Brasileira de Etologia, 1998.

BYRNES, E. M.; RIGERO, B. A.; BRIDGES, R. S. Opioid receptor antagonism during early lactation results in the increased duration of nursing bouts. **Physiology & Behavior**, v. 70, p. 211-216, 2000.

BYRNES, E. M.; RIGERO, B. A.; BRIDGES, R.S. Dopamine antagonists during parturition disrupt maternal care and the retention of maternal behavior in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 869-875, 2002.

CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 235-272, 2003.

CASADA, J. H.; DAFNY, N. Responses of neurons in bed nucleus of the stria terminalis to microiontophoretically applied morphine, norepinephrine and acetylcholine. **Neuropharmacology**, v. 32, nº 3, p. 279-284, 1993.

CHAMPAGNE, F.; Diorio, J.; SHARMA, S.; MEANEY, M. J. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. **PNAS**, v. 22, p. 12736-12741, 2001.

DALSASS, M.; SIEGEL, A. Opioid peptide regulation of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis: a microiontophoretic study. **Brain Research**, v. 531, p. 346-349, 1990.

de OLMOS, J.; ALHEID, G. F.; BELTRAMINO, C. A. Amygdala. In: Paxinos, G. **The rat nervous system**. Australia: Academic Press, v. 1, 1985, p. 223-334.

DESCHAMPS, S.; WOODSIDE, B.; WALKER, C. D. Pups presence eliminates the stress hyporesponsiveness of early lactating females to a psychological stress representing a threat to the pups. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, p. 486-497, 2003.

DONDI, D.; MAGGI, R.; PANERAI, A. E.; PIVA, F.; LIMONTA, P. Hypothalamic opiate tone during pregnancy, parturition and lactation in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 53, p. 460-466, 1991.

DOUGLAS, A. J.; CLARKE, G.; MACMILLAN, S. J.; BULL, P. M.; NEUMANN, I.; WAY, S. A.; WRIGHT, D. M.; McGRORY, B. G.; RUSSELL, J. A. Effects of the kappa-opioid agonist U50,488 on parturition. **Brazil Journal Pharmacology**, May, v. 109, n° 1, p. 251-258, 1993.

DOUGLAS, A. J.; NEUMANN, I.; MEEREN, H. K. M.; LENG, G.; JOHNSTONE, L. E.; MUNRO, G.; RUSSELL, J. A. Central endogenous Opioid inhibition of supraoptic oxytocin neurons in pregnant rats. **The Journal of Neuroscience**, July, v. 15, n° 7, p. 5049-5057, 1995.

FOLLESA, P.; FLORIS, S.; TULIGI, G.; MOSTALLINO, M. C.; CONCAS, A.; BIGGIO, G. Molecular and functional adaptation of the GABA_a receptor complex during pregnancy and delivery in the rat brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, p. 2905-2912, 1998.

FRANCIS, D. D.; CHAMPAGNE, F.; MEANEY, M. J. Variations in maternal behavior are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 12, p. 1145-1148, 2000.

FUCHS, A. R.; FIELDS, M. J.; FREIDMAN, S.; SHEMESH, M.; IVELL, R. Oxytocin and the timing of parturition: influence of oxytocin receptor gene expression, oxytocin secretion, and oxytocin induced prostaglandin F_{2α} and E₂ release. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 395, p. 405-420, 1995.

GANONG, W. F. **Fisiologia Médica**. 5^a ed. São Paulo: Atheneu, 1989.

GRAY, T.S. Amygdaloid CRF pathways. **ANYAS**, v. 697, p. 53-60, 1993.

HALLER, J.; FUCHS, E.; HALÁSZ, J.; MAKARA, G. M. Defeat is a major stressor in males while social instability is stressful mainly in females: towards the development of a social stress model in female rats. **Brain Research Bulletin**, v. 50, n° 1, p. 33-39, 1998.

HAMMER, R. P. Jr^o; MATEO, A. R.; BRIDGES, R. S. Hormonal regulation of medial preoptic μ-opiate receptor density before and after parturition. **Neuroendocrinology**, v. 56, p. 38-45, 1992.

HAND, G. A.; HEWITT, C. B.; FULK, L. J.; STOCK, H. S.; CARSON, J. A.; DAVIS, J. M.; WILSON, M. A. Differential release of corticotropin-releasing hormone (CRH) in the amygdala during different types of stressors. **Brain Research**, v. 949, p. 122-130, 2002.

HELMSTETTER, F. J.; BELLGOWAN, P. S. Effects of muscimol applied to the basolateral amygdala on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. **Behavior Neuroscience**, v. 108, p. 1005-1009, 1994.

HILTON, S. M.; ZBROZYNA, A. W. Amygdaloid region for defence reactions and its efferent pathway to the brain stem. **Journal of Physiology**, v. 165, p. 160-173, 1963.

HOUSHAM, S. J.; TERENCE, M. G.; INGRAM, C. D. Evidence for an opioid involvement in the delayed response of limbic neurons to oxytocin on the day of parturition in the anaesthetized rat. **Journal of Physiology**, v. 489, p.176, 1995.

INGRAM, C. D.; ADAMS, T. S. T.; JIANG, Q. B.; TERENCE, M. G.; LAMBERT, R.C.; WAKERLEY, J. B.; MOOS, F. Limbic regions mediating central actions of oxytocin on the milk-ejection reflex in the rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 7, p. 1-13, 1995.

INSEL, T. R.; SHAPIRO, L. E. Oxytocin receptors and maternal behavior. In: Pedersen, C. A.; Caldwell, J. D.; Jirikowski, G. F.; Insel, T. R. (ed.) **Oxytocin in maternal, sexual, and social behaviors**. New York: ANYAA, v. 652, p. 122-141, 1992.

JASNOW, A M.; HUHMANN, K. L. Activation of GABA receptors in the amygdala blocks the acquisition and expression of conditioned defeat in Syrian hamsters. **Brain Research**, v. 920, p. 142-150, 2001.

JIRIKOWSKI, G. F.; CALDWELL, J. D.; PILGRIM, C.; STUMPF, W. E.; PEDERSEN, C. A. Changes in immunostaining for oxytocin in the forebrain rat during late pregnancy, parturition and early lactation. **Cell Tissue Research**, v. 256, p. 411-417, 1989.

JU, G.; SWANSON, L. W.; SIMERLY, R. B. Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat: II. Chemoarchitecture. **The Journal of comparative neurology**, v. 280, p. 603-621, 1989.

KELLEY, A.E.; BLESS, E.P.; SWANSON, C.J. Investigation of the effects of piate antagonists infused into the nucleus accumbens on feeding and sucrose drinking in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapy**, v. 278, n° 3, p. 1499-1507, 1996.

LAZZAROTTO M.; FRANCO, V. K. B.; PAVESI, E.; TERENCE, M. G.
Efeito da microinjeção de agonistas opióides nos núcleos da estria terminal no comportamento maternal e amamentação em ratas. **Anais XI Seminário de Iniciação Científica da UFSC**, p. 431, 2001.

LENG, G.; MANSFIELD, S.; BICKNELL, R. J.; DEAN, A. P. D.; YATES, J. O.; DYER, R.G. Central opioids: a possible role in parturition? **Journal of Endocrinology**, v. 106, p. 219-224, 1985.

LENG, G.; MANSFIELD, S.; BICKNELL, R.; BROWN, D.; CHAPMAN, C.; HOLLINGSWORTH, S.; INGRAM, C. D.; MARSH, M. I. C.; YATES, J. O.; DYER, R. G. Stress-induced disruption of parturition in the rat may be mediated by endogenous opioids. **Journal of Endocrinology**, v. 114, p. 247-252, 1987.

LENG, G.; MANSFIELD, S.; BICKNELL, R. J.; BLACKBURN, R. E.; BROWN, D.; CHAPMAN, C.; DYER, R. G.; HOLLINGSWORTH, S.; SHIBUKI, K.; YATES, J. O.; WAY, S. Endogenous opioid actions and effects of environmental disturbance on parturition and oxytocin secretion in rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, p. 345-356, 1988.

LENG, G.; RUSSELL, J. A. Opioids, oxytocin and parturition. In: Dyer, R. G.; Bicknell, R. J. (ed.) **Brain Opioid Systems in Reproduction**. NY: Oxford University Press, 1989, p. 231-255.

LESSCHER, H. M. B.; BAILEY, A.; BURBACH, J. P. H.; REE, J. M.; KITCHEN, I.; GERRITS, M. A. F. M. Receptor-selective changes in μ -, δ - and κ -opioid receptors after chronic naltrexone treatment in mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 1006-1012, 2003.

LIPSCHITZ, D. L.; CROWLEY, W. R.; BEALER, S. L. Central blockade of oxytocin receptors during late gestation disrupts systemic release of oxytocin during suckling in rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, p. 743-748, 2003.

MANSOUR, A.; KHACHATURIAN, H.; LEWIS, M. E.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Anatomy of CNS opioid receptors. **TINS**, v. 11, p. 308-314, 1988.

MANSOUR, A.; FOX, C.A.; AKIL, H.; WATSON, S.J. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. **TINS**, v. 18, n° 1, p. 22-29, 1995.

MATSUI, H.; YAMAMOTO, C. Neuronal sensitivity to opiate and opioid peptides in the bed nucleus of the stria terminalis: effects of chronic treatment with morphine. **Neuropharmacology**, v. 23, n° 7A, p. 755-762, 1984.

McLEAN, S.; ROTHMAN, R. B.; HERKENHAM, M. Autoradiographic localization of μ - and δ - opiate receptors in the forebrain of the rat. **Brain Research**, v. 378, p. 49-60, 1986.

MEZZACAPPA, E. S.; TU, A. Y.; MYERS, M. M. Lactation and weaning effects on physiological and behavioral response to stressors. **Physiology & Behavior**, v. 78, p. 1-9, 2003.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; NASELLO, A. G.; FELICIO, L. F. Morphine pretreatment increase opioid inhibitory effects on maternal behavior. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n° 4, p. 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 behavior. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 667-674, 2003.

MORGAN, H. D.; WATCHUS, J. A.; MILGRAM, N. W.; FLEMING, A. S. The long lasting effects of electrical stimulation of the medial preoptic area and medial amygdala on maternal behavior in female rats. **Behavioural Brain Research** , v. 99, p. 61-73, 1999.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 6ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2000.

NEUMANN, I.; RUSSELL, J. A.; LANDGRAF, R. Oxytocin and vasopressin release within the supraoptic and paraventricular nuclei of pregnant, parturient and lactating rats: a microdialysis study. **Neuroscience**, v. 53, nº 1, p. 65-75, 1993.

NEUMANN, I. D.; TOSCHI, N.; OHL, F.; TORNER, L.; KRÖMER, S. A. Maternal defence as an emotional stressor in female rats: correlation of neuroendocrine and behavioural parameters and involvement of brain oxytocin. **European Journal of Neuroscience**, v. 13, p. 1016-1024, 2001.

PARDON, MC.; GÉRARDIN, P.; JOUBERT, C.; PÉREZ-DIAZ, F.; COHEN-SALMON, C. Influence of prepartum chronic ultramild stress on maternal pup care behavior in mice. **Biological Psychiatry**, v. 47, p. 858-863, 2000.

PAXINOS, G., WATSON, C. **The Rat Brain in stereotaxia coordinates**. EUA:Academia Press, 1998.

PEDERSEN, C. A.; CALDWELL, J. D.; PETERSON, G.; WALKER, C. H.; MASON, G. A. Oxytocin activation of maternal behavior in the rat. In: Pedersen, C. A.; Caldwell, J. D.; Jirikowski, G. F.; Insel, T. R. (ed.) **Oxytocin in maternal, sexual, and social behaviors**. New York: ANYAA, v. 652, p. 58-69, 1992.

POUGH, F. H.; HEISER, J. B.; McFARLAND, W. N. **A vida dos vertebrados**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 1993.

RANG, H. P.; DALE, M. .M.; RITTER, J. M. **Pharmacology**. 3rd. EUA: Churchill Livingstone, 1996.

RAO, Z. R.; YAMANO, M.; SHIOSAKA, S.; SHINOHARA, A.; TOHYAMA, M. Origin of leucine-enkephalin fibers and their two main afferent pathways in the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. **Experimental Brain Research**, v.65, p. 411-420, 1987.

RUSSELL, J. A.; GOSDEN, R. G.; HUMPHREYS, E. M.; CUTTING, R.; FITZSIMMONS, N.; JOHNSTON, V.; LIDDLE, S.; SCOTT, S.; STIRLAND, J. A. Interruption of parturition in rats by morphine: a result of inhibition of oxytocin secretion. **Journal Endocrinology**, v. 121, p. 521-536, 1989.

RUSSELL, J. A.; DOUGLAS, A. J.; BULL, P. M.; LENG, G.; BICKNELL, R. J. Changing interactions of opioids with oxytocin neurones in pregnancy. **Neurohypophysiology: Recent Progress of Vasopressin and Oxytocin Research**, p. 275-288, 1995.

RUSSELL, J. A.; DOUGLAS, A. J.; INGRAM, C. D. Brain preparations for maternity – adaptative changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview. **Progress in Brain Research**, v. 133, p. 1-38, 2001. (The Maternal Brain – neurobiological and neuroendocrine adaptation and disorders in pregnancy and post partum)

SANDERS, S. K.; SHEKHAR, A. Regulation of anxiety by GABA_a receptors in the rat amygdala. *Pharmacol.* **Biochemisical Behavioral**, v. 52, p. 701-706, 1995.

SANTOS, B. F. Criação e manejo de ratos. In: Andrade, A.; Pinto, S. C.; Oliveira, R. S. (org.) **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fio Cruz, 2002.

SAWADA, S.; YAMAMOTO, C. Postsynaptic inhibitory actions of catecholamines and opioid peptides in the bed nucleus of the stria terminalis. **Experimental Brain Research**, v. 41. p. 264-270, 1981.

SHEEHAN, T.; PAUL, M.; AMARAL, E.; NUMAN, M. J.; NUMAN, M. Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats. **Neuroscience**, v. 106, n° 2, p. 341-356, 2001.

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

SPANIS, C.W.; BIANCHIN, M.M.; IZQUIERDO, I.; McGAUGCH, J.L. Excitotoxic basolateral amygdala lesions potentiate the memory impairment effect of muscimol injected into the medial septal area. **Brain Research**, v. 816, n°2, p. 329-336, 1999.

STACK, E. C.; BALAKRISHNAN, R.; NUMAN, M. J.; NUMAN, M. A functional neuroanatomical investigation of the role of the medial preoptic area in neural circuits regulating maternal behavior. **Behavioral Brain Research**, v. 131, p. 17-36, 2002.

STAFISSO-SANDOZ, G.; POLLEY, D.; HOLT, E.; LAMBERT, K. G.; KINSLEY, C. H. Opiate disruption of maternal behavior: morphine reduces, and naloxone restore, *c-fos* activity in the medial preoptic area of lactating rats. **Brain Research Bulletin**, v. 45, n° 3, p. 307-313, 1998.

TERENZI, M. G.; HOUSHAM, S. J.; INGRAM, C. D. Effect of stria terminalis lesions on the activation of limbic neurones by central oxytocin and the facilitation of the milk-ejection reflex in the rat. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 16, p. 26, 1995.

TUCKER, H. A. Lactation and its hormonal control. In: Knobil, E.; Neill, J.D. (ed.) **The Physiology of Reproduction**. 2nd. New York: Raven Press, 1994.

UHL, G. R.; KUCHAR, M. J.; SNYDER, S. H. Enkephalin-containing pathway: amygdaloid efferents in the stria terminalis. **Brain Research**, v. 149, p. 223-228, 1978.

WAKERLEY, J. B.; CLARKE, G.; SUMMERLEE, A. J. S. Milk ejection and its control. In: Knobil, E.; Neill, J. D. (ed.) **The Physiology of Reproduction**. 2nd. New York: Raven Press, 1994.

WARDLAW, S. L., FRANTZ, A. Brain β -endorphin during pregnancy, parturition, and the postpartum period. **Endocrinology**, v. 113, n° 5, p. 1664-1668, 1983.

WAY, S. A.; DOUGLAS, A. J.; DYE, S.; BICKNELL, R. J.; LENG, G.; RUSSELL, J.A. Endogenous opioid regulation of oxytocin release during parturition in ovariectomized rats. **Journal of Endocrinology**, v. 138, p. 13-22, 1993.

WIGGER, A.; LORSCHER, P.; OEHLER, M.; KECK, M. E.; NARUO, T., NEUMANN, I. D. Nonresponsiveness of the rat hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis to parturition-related events: inhibitory action of endogenous opioids. **Endocrinology**, v. 140, n° 6, p. 2843-2949, 1999.

WIGGER, A.; NEUMANN, I. D. Endogenous opioid regulation of stress-induced oxytocin release within the hypothalamic paraventricular nucleus is reversed in late pregnancy: a microdialysis study. **Neuroscience**, v. 112, n° 1, p. 121-129, 2002.

ZHANG, M.; KELLEY, A.E. Opiate agonist microinjected into the nucleus accumbens enhance sucrose drinking in rats. **Psychopharmacology**, v. 132 , n° 4, p. 350-360, 1997.