

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

**PAPEL DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL NA  
MODULAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNAL E LACTAÇÃO  
EM RATAS ESTRESSADAS**

**ELOISA PAVESI**

Florianópolis, 2006

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

**PAPEL DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL NA  
MODULAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNAL E LACTAÇÃO  
EM RATAS ESTRESSADAS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Graciela Terenzi

Florianópolis, 2006

*"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis"*  
*(Fernando Pessoa)*

Dedico este trabalho a minha querida vovó  
(in memoriam), por todo o amor, incentivo e  
ajuda que me deram forças em todas as  
situações;

Aos meus pais, que são a base da minha  
vida...

## AGRADECIMENTOS

Agradeço de um modo especial a minha orientadora, minha mestre, amiga e incentivadora do meu trabalho, por toda a paciência em guiar meus primeiros passos,

Ao professor Cláudio (grande amigo Rato) que permitiu a realização da imunohistoquímica e que tão carinhosamente abriu as portas do laboratório.

Ao professor Newton Canteras, que me ajudou na microscopia e contagem de Fos.

Aos professores André, Marino, Cilene e Pádua, por toda a atenção especial e disponibilidade em me atender quando precisei.

Agradeço muito as amigas que me ajudaram na árdua tarefa do laboratório, com muito carinho, a Dani, a Michelle e a Mirella.

Aos professores, funcionários e amigos do departamento de Fisiologia, pela amizade e momentos de descontrações.

Aos meus amigos que conheci em São Paulo durante a realização deste projeto, Renato, João, Roberta, Eliane, Maurício...e em especial a Marcinha, que além da ajuda no laboratório se tornou uma grande companheira e verdadeira amiga.

Agradeço as pessoas que compartilharam momentos especiais, a Virgínia, a Michelle, a Tati, a Ediléia, a Daiana, as meninas do ap 301...e a tantas pessoas que estão em meu coração. Muito obrigada por tudo...

As minha irmãs Sabrina e Cleide.

Gostaria de agradecer à Deus, pela vida e por guiar meus caminhos;

RESUMO

Diversos estudos têm mostrado que a administração sistêmica ou central de opióides inibe o comportamento maternal em ratas lactantes. O sítio de atuação destes opióides é incerto, mas a substância cinzenta periaquedutal (PAG) parece ser importante, uma vez que a administração sistêmica de morfina ativa a região lateral da PAG e inibe o comportamento maternal durante a lactação em ratas. O comportamento maternal também é sensível ao estresse ambiental, como por exemplo a exposição da fêmea a um ambiente estranho ou a apresentação de um macho intruso no ambiente. O objetivo deste projeto foi investigar se diferentes tipos de estresse inibem o comportamento maternal diferentemente e se a região lateral da PAG seria ativada durante situações de estresse. Um segundo objetivo foi verificar se as alterações do comportamento maternal pelo estresse são devidas à liberação de opióides na PAG lateral.

**Experimento 1:** Ratas Wistar (250g) foram acasaladas e monitoradas até o momento do parto. Após o parto, as ratas foram divididas em quatro grupos: C, n=5 (ratas não estressadas), E1, n=5 (ratas foram colocadas com os filhotes na presença de um macho estranho no 9º dia de lactação), E2, n=5 (ratas foram estressadas pela retirada da caixa e junto com outra fêmea lactante colocadas em outra caixa na presença de um macho durante 2h diárias por 6 dias, do 3º ao 8º dia de lactação; o comportamento foi analisado no 9º dia de lactação, na própria caixa, sem a presença de intrusos) e E1+2, n=5 (ratas foram estressadas conforme o E2 exceto que no 9º dia de lactação foram estressadas conforme o E1). Em todos os grupo o comportamento maternal foi analisado durante 1h no 9º dia de lactação. Ratas submetidas a E1 demoraram mais para recolher os filhotes, demoraram mais para iniciar a amamentação e passaram mais tempo em atividades não maternais e menos tempo amamentando os filhotes. Os grupos E2 e E1+2 não apresentaram mudança de comportamento em relação ao controle.

**Experimento 2:** Ratas foram acasaladas e submetidas às condições de estresse anteriores (n=5 de cada grupo), 90 min após o experimento, no 9º dia de lactação, foram perfundidas e o cérebro foi retirado e processado para a detecção imunohistoquímica de Fos na PAG. Ratas do grupo E1 apresentaram aumento de Fos em relação às ratas não estressadas em todos os níveis (Bregma -5,6 a -7,6 mm) na região lateral da PAG. Ratas submetidas a E2 e E1+2 apresentaram diminuição na expressão de Fos na coluna dorsomedial e dorsolateral comparadas ao controle.

**Experimento 3:** Ratas Wistar (250g) foram acasaladas e submetidas a cirurgia estereotáxica para a implantação unilateral de cânulas-guia na PAGl. Após o parto foram submetidas às condições comportamentais conforme o exp. 1. No dia do teste, 9º dia de lactação, foram divididas para receberem microinjeção de salina (grupo controle) ou de antagonista opióide (naltrexona, naloxonazina ou nor-BNI) e o comportamento maternal foi monitorado por 1h. Em ratas submetidas a E1, os antagonistas revertem os efeitos do estresse no progresso do recolhimento, no início e no tempo de amamentação.

Com estes resultados podemos concluir que o estresse agudo (apresentação do macho estranho) interfere com o comportamento maternal. A condição de estresse crônico isoladamente não interfere na interação das mães com os filhotes, no entanto, previne os efeitos deletérios do estresse agudo no comportamento maternal. A PAG lateral participa ativamente da resposta ao estresse agudo, enquanto que o estresse crônico impede a expressão de Fos nesta região nos animais expostos a estresse agudo. Os antagonistas opióides na PAGl revertem os efeitos do estresse agudo no comportamento maternal. Um circuito inibitório opióide poderia ser responsável por uma desinibição da PAGl, levando a prejuízos no comportamento maternal das ratas. O estresse crônico, por outro lado, promove mudanças plásticas nesta circuitaria e impede o efeito inibitório do estresse agudo no comportamento das mães.

## ABSTRACT

It has long been known that systemic, or central, administration of opioids inhibits maternal behaviour in lactating rats. Although the precise brain targets have not been determined, the periaqueductal brain (PAG) seems to be involved because systemic administration of morphine activates Fos expression in the lateral PAG and at the same time inhibits maternal behaviour in lactating animals. Maternal behaviour is also disrupted by stressful situations, for example, by moving the lactating female and her litter to a new cage or by exposing the dam and litter to a male intruder rat. The aim of this project was to investigate whether different stressing environmental situations would alter maternal behaviour in different ways and to verify if the lateral PAG is activated during stressful manipulations in lactating rats. A second aim was to detect whether opioids released into the lateral PAG are involved in these effects.

**Experiment 1:** Nulliparous pregnant female Wistar rats (250g), were monitored until parturition and split in four groups: C, n=5 (non-stressed control rats), E1, n=5 (rats exposed to a unfamiliar male rat on the 9<sup>th</sup> day of lactation), E2, n=5 (rats stressed by daily 2h exposure to another lactating female and a male rat from day 3 to day 8 of lactation, and tested on the 9<sup>th</sup> day in their home cage, without other rats), and E1+2, n=5 (rats stressed as in E2 except that on the 9<sup>th</sup> day they were also treated as in E1). All groups had their maternal behaviour recorded and analysed on day 9 of lactation for 1 h. The E1 group rats spent more time retrieving their pups, took longer to initiate nursing, nursing bouts were shorter, and spent more time in non-maternal activities compared to the control (C) group. On the other hand, rats submitted to the stress protocols E2 and E1+2 did not differ from the control group.

**Experiment 2:** Nulliparous pregnant female Wistar rats (250g), were monitored until parturition and split in four groups of 5 animals each. The groups and treatments were identical to the ones described above. Ninety minutes after the end of the 1 h observation period (9<sup>th</sup> day of lactation) the rats were killed by an overdose of anaesthetic and perfused with 4 % paraformaldehyde fixative. Their brains were then removed and processed for immunohistochemical detection of Fos protein in the PAG area. Fos expression increased in the lateral PAG only in the rats stressed as in E1. Rats from the E2 and E1+2 showed decrease in Fos expression in the dorsolateral and dorsomedial PAG compared to non-stressed animals.

**Experiment 3:** Nulliparous pregnant female Wistar rats (250g), were stereotaxically implanted with cannulae into the lateral PAG. After delivery the animals were assigned to four stress groups as in experiment 1. On the day of the experiment (day 9 of lactation) each of the four groups were further divided into four: Saline (control) or opioid antagonist (naltrexone, naloxonazine or nor-binaltorphimine). Maternal behaviour was analysed for 1h after the microinjection of the drug. Interestingly, the antagonists blocked the effects of stress in the E1 treated animals compared to saline injected controls.

We can thus conclude that acute stress (a single exposure to a unfamiliar male during lactation) disrupts maternal behaviour. However, when the lactators are chronically exposed to other unfamiliar rats (male and female) they do not show deleterious effects in their maternal behavior. More importantly, chronic stress prevents the disruptive effects of acute stress. The lateral PAG is activated by acute stress but not by chronic stress, furthermore, chronic stress prevents the activation of this region by acute stress. Opioid antagonists injected into the lateral PAG reverse the inhibition of maternal behaviour in the animals exposed to the male intruder (acute stress). This suggests that an opioid inhibitory circuit activated by stress could desinhibit neurones in the lateral PAG, these neurones could be responsible for the decrease in maternal behaviour caused by stress. Chronic stress, on the other hand, might promote plastic changes in this circuitry, altering the way it responds to acute stress.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	13
1. Comportamento Maternal .....	14
2. Áreas cerebrais envolvidas na regulação do comportamento maternal .....	17
3. Estresse e comportamento maternal .....	18
4. Participação dos opióides no comportamento maternal .....	20
5. Envolvimento da substância cinzenta periaquedutal na modulação da resposta ao estresse e do comportamento maternal .....	21
OBJETIVOS .....	25
1. Objetivo Geral .....	26
2. Objetivos Específicos .....	26
MATERIAIS E MÉTODOS .....	27
1. Animais .....	28
2. Acasalamento .....	28
3. Experimento 1: Efeito do estresse agudo e crônico na expressão do comportamento maternal em ratas lactantes .....	29
3.1 Grupos experimentais .....	29
3.2 Análise do comportamento maternal .....	31
4. Experimento 2: Participação da PAG no comportamento maternal em ratas lactantes normais ou submetidas a estresse agudo e crônico .....	32
4.1 Perfusão .....	33
4.2 Microtomia .....	33
4.3 Detecção imunohistoquímica de Fos .....	34
5. Experimento 3: Efeito da microinjeção de antagonistas opióides na PAGI no comportamento maternal em ratas lactantes normais ou submetidas a estresse agudo e crônico .....	35
5.1 Cirurgia estereotáxica .....	35
5.2 Tratamentos .....	36
5.3 Microinjeção .....	37
5.4 Histologia .....	38
6. Análise estatística .....	39
RESULTADOS .....	40
1. Experimento 1: Efeito do estresse agudo e crônico na expressão do comportamento maternal em ratas lactantes .....	41
1.1 Progresso de Recolhimento .....	41
1.2 Início da Amamentação .....	43
1.3 Filhotes no Ninho .....	44
1.4 Tempo de Amamentação .....	45
1.5 Tempo Maternal .....	47
1.6 Tempo Não Maternal .....	48
1.7 Análise minuto-a-minuto .....	50

2. Experimento 2: Participação da PAG no comportamento maternal em ratas lactantes normais ou submetidas a estresse agudo e crônico.....	54
3. Experimento 3: Efeito da microinjeção de antagonistas opióides na PAGI no comportamento maternal em ratas lactantes normais ou submetidas a estresse agudo e crônico. ....	65
3.1 Progresso de Recolhimento .....	65
3.2 Início da Amamentação.....	70
3.3 Filhotes no Ninho .....	72
3.4 Tempo de Amamentação .....	74
3.5 Tempo Maternal .....	76
3.6 Tempo Não Maternal.....	78
3.7 Análise minuto-a-minuto.....	80
DISCUSSÃO .....	92
1. Inibição do comportamento maternal pelo estresse .....	93
2. Alterações na expressão de Fos nas colunas dorsomedial, dorsolateral e lateral da PAG pelo estresse .....	98
3. Antagonistas opióides na PAGI restabelecem o comportamento maternal normal em ratas estressadas.....	103
CONCLUSÕES .....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	110
ANEXOS .....	118
ANEXO A – Coloração de Tetróxido de Ósmio .....	119
ANEXO B – Coloração de Giemsa .....	120
ANEXO C - Coloração de Nissl .....	121

## INTRODUÇÃO

## 1. Comportamento Maternal

O comportamento maternal em mamíferos compreende todo o cuidado oferecido pela progenitora aos seus filhotes, garantindo a sobrevivência e o crescimento destes, desde o nascimento até que desenvolvam características e habilidades que permitam sua própria sobrevivência (Brown, 1998). Em ratas, o comportamento maternal envolve duas classes: uma direcionada aos filhotes, como o recolhimento, o agrupamento, o agachamento sobre a ninhada para iniciar a amamentação e promover o aquecimento, a limpeza para estimular os reflexos de micção e defecação, e outra classe de comportamentos não direcionada aos filhotes diretamente, como a construção de ninho e a agressão maternal a intrusos (Stafisso-Sandoz et al, 1997; Bridges et al, 1999). Dentre os vários comportamentos acima descritos, o recolhimento dos filhotes é o comportamento maternal mais frequentemente quantificado. O recolhimento é uma complexa seqüência motora, repetitiva e dependente de dopamina. Injeção sistêmica de antagonistas de receptores de dopamina reduz a latência para o recolhimento dos filhotes, enquanto que esse efeito é revertido com a administração concomitante de agonistas de receptores dopaminérgicos (Keer e Stern, 1999).

O comportamento maternal é um comportamento cujo início depende do estado hormonal e do processamento de uma variedade de estímulos externos associados com os filhotes (Russell, 2005). No início da gravidez, altas concentrações de progesterona e de estradiol permitem o crescimento do útero e dos ductos mamários. No final da gestação, os níveis de progesterona caem e a concentração plasmática de estradiol e prolactina aumentam, preparando o

organismo para o parto e a lactação (Neville e Morton, 2001). Após o parto, o reconhecimento dos filhotes através de vias olfatórias é essencial para o início e a manutenção do comportamento maternal normal (Calamandrei e Keverne, 1994). Em fêmeas virgens, o comportamento maternal pode ser induzido pela exposição diária aos filhotes (Sheehan et al, 2001).

A lactação é um dos comportamentos maternos indispensáveis para o crescimento e o desenvolvimento dos recém-nascidos. Os filhotes começam a mamar logo após o nascimento. Durante o parto, a mãe coloca os filhotes um a um no ninho e debruça-se sobre eles, tomando a postura de amamentação que facilita o acesso aos mamilos. Lonstein et al (1998b) descreve essa postura de amamentação como cifose, que é caracterizada pela imobilidade, simetria bilateral, suporte rígido dos membros sobre a ninhada e uma pronunciada arqueação da coluna vertebral. Normalmente essa postura ocorre em resposta ao estímulo de sucção dos filhotes. A estimulação dos mecanoreceptores no mamilo promove a inibição da secreção de dopamina e aumento da secreção de TRH (hormônio liberador de tireotrofina) pelas células hipotalâmicas, promovendo o aumento da secreção de prolactina pelas células lactotróficas da hipófise anterior. Esse hormônio promove a síntese láctea e, juntamente com a oxitocina, liberada pela neurohipófise, promovem o reflexo de ejeção de leite (Neville e Morton, 2001).

A oxitocina tem papel importante durante o parto, na lactação e no estabelecimento do comportamento maternal. No período de peri-parto, o sistema oxitocinérgico cerebral é ativado, indicado pelo aumento da síntese de oxitocina nos neurônios magnocelulares dos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo (Neumann et al, 2000). Além disso, o aumento da densidade de

receptores de oxitocina em alguma área cerebrais, como na amígdala e na área pré-óptica medial, e na periferia (útero e glândulas mamárias) no final da gravidez é resultado do aumento da expressão do gene deste receptor (Russell e Leng, 1998). Dentro do cérebro, a oxitocina ativa toda a circuitaria envolvida com o comportamento maternal. A oxitocina é liberada através de projeções neuronais para regiões onde o comportamento maternal é organizado, como a área pré-óptica medial e os núcleos do leito da estria terminal. Uma das ações da oxitocina sobre o cérebro é a redução da ansiedade, responsável por reduzir as respostas neuroendócrinas ao estresse na gravidez e lactação (Russell, 2005).

Antagonistas de oxitocina retardam o nascimento do primeiro filhote, mas quando administrados após o nascimento do quarto filhote não causam nenhum efeito no tempo restante do parto (Russell e Leng, 1998). Os antagonistas de oxitocina atrasam o comportamento maternal no período pós-parto. Esses antagonistas injetados diretamente na área pré-óptica medial e na área tegmental ventral do cérebro de fêmeas no pós-parto inibem o início do comportamento maternal (Pedersen et al, 1994), mas não alteram os parâmetros do comportamento agressivo na presença de intruso (Neumann et al, 2001). O comportamento de agressão maternal não é regulado pela oxitocina cerebral, e o antagonista de oxitocina não modifica o tempo de comportamento ofensivo. A agressão maternal é baixa imediatamente após o parto, mas aumenta no período da lactação. As mudanças endócrinas, como o aumento da secreção de prolactina, que ocorrem durante a lactação, parecem ser responsáveis por esse aumento da agressão (Pardon et al, 2000, Neumann et al, 2001). O aumento da agressão maternal é acompanhado pela diminuição da ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado (Ferreira et al, 2002).

## 2. Áreas cerebrais envolvidas na regulação do comportamento maternal

Duas regiões são essenciais para a regulação do comportamento maternal em ratas: a área pré-óptica medial do hipotálamo e a parte ventral do núcleo do leito da estria terminal (Stack et al, 2002). A área pré-óptica medial contém alta concentração de receptores ligantes a estradiol e a progesterona, e seria o sítio central onde esteróides gonadais como a progesterona e o estradiol influenciariam o comportamento em adultos. Lesões nessa região bloqueiam vários comportamentos maternos, como o recolhimento, a construção de ninho, a amamentação e outras atividades direcionadas aos filhotes (Wellman et al, 1997). Ratas com dessensibilização das vias olfatórias não apresentam aumento de Fos nessa região, indicando a importância do sistema olfatório na ativação da área pré-óptica medial durante o estabelecimento do comportamento maternal (Fleming e Walsh, 1994). Calamandrei e Keverne (1994) mostraram que a presença dos filhotes, sem nenhum contato físico com a mãe, promove o aumento da expressão de Fos em áreas olfatórias do cérebro, mas não na área pré-óptica medial, sendo a interação com os filhotes, como limpeza, recolhimento e agachamento uma condição indispensável para ativar essa região (Numan e Numan, 1995).

Neurônios da área pré-óptica medial do hipotálamo e do núcleo do leito da estria terminal projetam-se direta ou indiretamente para muitas regiões do encéfalo que estão envolvidas na regulação do comportamento das mães, como o septo lateral, habênula lateral, núcleo accumbens, área tegmental ventral e substância cinzenta periaquedutal (*periaqueductal gray*, PAG) (Stack et al, 2002). Todas essas regiões aumentam a expressão de Fos durante o contato físico com

os filhotes, independente do estímulo de sucção dos mamilos pelos filhotes (Lonstein et al, 1998b).

### **3. Estresse e comportamento maternal**

Estímulos estressantes ao animal provocam fenômenos biológicos complexos, que envolve tanto componentes fisiológicos quanto psicológicos e comportamentais (Ramos et al, 1998). A reprodução é um dos aspectos que pode ser afetado pelo estresse, resultando, por exemplo, em infertilidade e alterações comportamentais (Dobson e Smith, 2000). Em ratos, ambientes não familiares ou distúrbios ambientais causam uma maior atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, aumentando a secreção de corticosterona no plasma desses animais (Blanchard et al, 2001). Diferentes modelos de estresse promovem reações diferentes entre machos e fêmeas. Haller et al (1998) tem demonstrado que machos e fêmeas de ratos são diferentemente afetados por dois diferentes modelos de estresse social: derrota causada pelo confronto com um animal residente agressivo e a instabilidade social obtida pela alternância entre períodos de isolamento e superpopulação da caixa. Através da medida de marcadores fisiológicos do estresse, como o peso corporal, o tamanho do timo, peso da adrenal e níveis plasmáticos de corticosterona, foi demonstrado que a derrota é maior estressor em machos enquanto que o modelo de instabilidade social é mais estressante para fêmeas. Palanza (2001) reportou que as condições de períodos de isolamento na caixa, que não são estressantes para machos, causam reações de estresse em fêmeas.

O comportamento maternal é um dos fenômenos que sofre interferência de diferentes procedimentos estressantes. Ratas gestantes expostas a um regime de estresse crônico durante sete dias, caracterizado por períodos de confinamento e inclinação da caixa, dificuldade de acesso a comida e reversão do ciclo de luminosidade (para maiores detalhes consultar Pardon et al, 2000) exibem distúrbios no comportamento defensivo de proteção dos filhotes contra o ataque de intrusos. Os efeitos comportamentais do estresse são sentidos agudamente principalmente no final da gestação (Neumann et al, 1998), resultando na inibição da secreção de oxitocina e na interrupção do parto (Leng e Russel, 1989). Dados obtidos em nosso laboratório demonstram que ratas lactantes em presença de um intruso macho no meio demoram mais para recolher os filhotes ao ninho e iniciar a amamentação (Medeiros, 2004).

Em relação aos mecanismos pelos quais o estresse inibe os reflexos neuroendócrinos do comportamento maternal sabe-se que o estresse ambiental aumenta a duração do parto por induzir a liberação de opióides endógenos, e o uso sistêmico de antagonista opióide naloxona reverte o prolongamento do parto (Leng et al, 1985, 1987 e 1988). Em mulheres, a dor e o estresse durante o parto aumentam significativamente a concentração de  $\beta$ -endorfina no plasma, diminuindo os pulsos de oxitocina (Leng et al, 1985). O estresse também inibe o reflexo de ejeção de leite pela liberação de opióides endógenos (Wakerley et al, 1994).

#### 4. Participação dos opióides no comportamento maternal

Opióides como a morfina (produzido a partir da papoula, *Papaver somniferum*) têm sido usados durante muitos séculos para o controle da dor. Além do seu conhecido efeito analgésico, os peptídios opióides estão envolvidos em uma variedade de processos fisiológicos e comportamentais, como os comportamentos de comer e beber, reprodução, estresse, emoções, aprendizado e homeostase (Sukhov et al, 1995). Diversos estudos têm mostrado que o comportamento maternal também é influenciado por opióides. A administração sistêmica de morfina durante a gestação prolonga o parto (Russel et al, 1989 e 1995) enquanto que administrada intracerebroventricularmente (i.c.v.) em ratas lactantes diminui o reflexo de ejeção de leite (Leng e Russel, 1989) e produz aversão ao odor dos filhotes (Kinsley et al, 1995). A infusão de  $\beta$ -endorfina no ventrículo cerebral lateral inibe o início do comportamento maternal em fêmeas lactantes após o parto (Felício et al, 1991). Ratas lactantes tratadas sistemicamente (i.p.) com morfina durante a gestação apresentam comprometimento na expressão do comportamento maternal no período da lactação (Miranda-Paiva et al, 2001, Slamberová et al, 2001). Além da inibição do comportamento direcionado ao filhote, a administração de opióides também reduz o comportamento agressivo maternal contra intrusos (Kinsley, 1994). Os opióides exercem efeito inibitório na atividade dos neurônios oxitocinérgicos no núcleo supraóptico, e também inibem a atividade do eixo HPA durante o progresso do parto (Wigger et al, 1999).

Os sítios de atuação dos opióides na inibição desses reflexos neuroendócrinos não são conhecidos, embora haja indicações de que receptores

opióides na área pré-ótica medial do hipotálamo sejam um alvo, ao menos na inibição do comportamento maternal (Byrnes et al, 2000). Infusões de  $\beta$ -endorfina nessa região durante a gestação interrompem a lactação em ratas durante o período pós-parto. Kinsley et al (1995) citam que a inibição do comportamento maternal pela morfina poderia ser devida à ação central de mecanismos sensoriais olfatórios, modificando a preferência ao odores dos filhotes. Dados obtidos em nosso laboratório mostram que a administração do agonista opióide  $\mu$  (DAGO) nos núcleos da estria terminal inibe a expressão do comportamento maternal em ratas lactantes (Pavesi et al, 2004), e enquanto que o agonista  $\kappa$  (Nor-Binaltorfimina) administrado durante o parto interfere no comportamento 24h pós-parto (Medeiros, 2004). Além da área pré-ótica medial e dos núcleos do leito da estria terminal, um outro alvo para a inibição do comportamento maternal poderia ser a PAG, como descrito na seção abaixo.

## **5. Envolvimento da substância cinzenta periaquedutal na modulação da resposta ao estresse e do comportamento maternal**

A PAG é uma região do mesencéfalo que circunda o aqueduto cerebral. A parte mais rostral da PAG coincide com a comissura posterior, e a parte mais caudal está situada a nível do núcleo tegmentar dorsal. A PAG é um importante sítio para a modulação da nocicepção. Esta região recebe aferências de neurônios nociceptivos da medula espinhal e projeta-se para os núcleos talâmicos que processam a nocicepção ventro-posterior. A PAG é também o maior componente do sistema inibitório descendente da dor (Behbehani, 1995). Além do processamento da dor, a PAG está envolvida em uma série de funções, como

vocalização, receptividade sexual, responsividade ao medo e contêm neurônios que integram o comportamento de defesa, como a fuga, as reações de congelamento e a imobilização tônica mediante um estímulo que gera respostas defensivas (Misslin, 2003). Estimulação elétrica e química da PAG causa respostas defensivas, enquanto que lesões reduzem essa resposta (Misslin, 2003), e podem até eliminar completamente a resposta defensiva (Greg e Siegel, 2001).

Bandler et al (1991), em estudos anatômicos com traçadores retrógrados e anterógrados e estudos de mapeamento funcional com microinjeção de aminoácidos excitatórios, dividiu a PAG em colunas com nítidas diferenças funcionais entre as mesmas. Em particular, destaca-se a região lateral da PAG que, juntamente com a coluna dorsolateral, é ativada em situações que provocam reações de confronto ou a fuga do estímulo estressor (Keay e Bandler, 2001). Essas reações são caracterizadas pelo aumento da atividade somatomotora, aumento da vigilância e mudanças circulatórias como hipertensão, taquicardia e alterações na perfusão regional, favorecendo a redistribuição de sangue para leitos vasculares com o aumento da necessidade metabólica. A PAG ventrolateral tem papel na expressão do comportamento de congelamento, e lesões nessa região diminuem essa resposta e aumentam a atividade locomotora (Farook et al, 2004). Vianna et al (2001) relatam que a região ventrolateral da PAG estaria envolvida com o aspecto motor da resposta ao congelamento através de projeções descendentes para a medula, enquanto que a região dorsolateral ativa a postura defensiva através das projeções ascendentes, responsável pelo processamento sensorial dos estímulos aversivos.

A PAG também parece estar envolvida na integração do comportamento maternal. Evidências baseadas na expressão de Fos mostram a ativação da PAG caudal lateral e ventrolateral e PAG rostral dorsolateral em ratas lactantes interagindo com os filhotes (Lonstein e Stern, 1998). Várias regiões da PAG são diferentemente envolvidas no controle dos componentes específicos do comportamento das ratas lactantes. A sucção dos mamilos pelos filhotes excita a região caudal lateral e ventrolateral da PAG, considerada como um sítio de integração sensoriomotora para a postura de cifose na amamentação (Keer e Stern, 1998). Lesões nessas mesmas regiões reduzem a posição de cifose induzida pela sucção dos mamilos e diminuem o ganho de peso dos filhotes (Lonstein et al, 1998b), enquanto que lesões na PAG rostral impedem o recolhimento eficiente dos filhotes ao ninho (Lonstein e Stern, 1998). A região rostral da PAG recebe aferências da área pré-óptica medial, e uma grande porcentagem de células dessa região que se projetam para a PAG rostral apresenta aumento de Fos em resposta ao comportamento maternal, sugerindo uma possível participação da PAG rostral dorsal e dorsolateral na expressão do comportamento de recolhimento e limpeza dos filhotes (Lonstein e Stern, 1998).

Além do comportamento maternal, a PAG também integra o comportamento de agressão durante a lactação. Ratas com a toda a PAG lesionada atacam um macho intruso duas vezes mais que ratas controle, sugerindo aumento da agressividade pelo aumento do número de ataques (Lonstein e Stern, 1997).

Estudos autoradiográficos com ligantes opióides específicos demonstraram que a PAG contém grande quantidade de receptores  $\mu$  e  $\kappa$  e uma pequena quantidade de receptores  $\delta$  (Mansour et al, 1988 e 1995). Durante a

gestação, o tratamento com morfina sistêmica ativa a região lateral da PAG, inibindo o comportamento maternal durante a lactação. Esse efeito inibitório é bloqueado por injeção unilateral de naloxona na PAGl (Miranda-Paiva et al, 2003). Assim, considerando a importância da participação da PAG nas reações ao estresse e no comportamento maternal, neste projeto nos propusemos investigar mais detalhadamente se a inibição do comportamento maternal pelo estresse poderia ser devida à liberação de opióides na PAG e qual coluna estaria envolvida neste processo.

## OBJETIVOS

## **1. Objetivo Geral**

Com esse projeto visamos investigar se a inibição de alguns parâmetros do comportamento maternal em ratas lactantes pelo estresse seria devida à liberação de opióides na substância cinzenta periaquedutal (PAG).

## **2. Objetivos Específicos**

- Determinar o efeito do estresse agudo e crônico na expressão do comportamento maternal em ratas lactantes;
- Analisar se há participação da PAG durante a exposição a estresse agudo e crônico em ratas lactantes;
- Verificar o efeito da microinjeção de naltrexona (antagonista opióide não seletivo) e antagonistas seletivos ( $\mu$  e  $\kappa$ , naloxonazina e nor-binaltorfimina respectivamente) na PAG lateral no comportamento maternal em ratas lactantes normais ou submetidas a estresse agudo e crônico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

## **1. Animais**

Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizados ratos Wistar, no total de 160 fêmeas, com a idade de 90 dias, pesando entre 180 e 220g, e 32 machos, de 60 dias, pesando de 280 a 320g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas durante a realização dos experimentos. Os animais foram mantidos em caixa de polietileno medindo 40X30cm, em um total de 4 animais por caixa.

Todos os animais tiveram livre acesso à água e ração para roedores (exceto durante a realização dos experimentos), e permaneceram em ciclo de claro/escuro de 12/12 h (luzes acesas entre 7 e 19 h), em temperatura de 22-24°C. Todas as observações foram realizadas entre 10 e 16h, e cada animal foi utilizado apenas uma vez.

Os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA, 23080.004380/2004-46), UFSC.

## **2. Acasalamento**

As fêmeas foram acasaladas com machos experientes (que já haviam sido utilizados anteriormente para acasalar outras fêmeas). Para determinar com exatidão o primeiro dia de gestação, as ratas tiveram amostras do epitélio vaginal examinadas diariamente durante o acasalamento.

As ratas foram contidas pelo dorso com auxílio de uma toalha, um conta-gotas foi preenchido com solução salina e cuidadosamente introduzido na abertura vaginal da rata. O fluido vaginal foi coletado pelo esvaziamento da solução salina e posterior aspiração. A rata foi devolvida à caixa e o fluido vaginal foi observado ao microscópio óptico, em aumento de 10X. A presença de espermatozoides foi utilizada como indicativo do primeiro dia de gestação e a partir deste momento as ratas foram colocadas em caixas individuais e observadas até o dia do parto.

### **3. Experimento 1: Efeito do estresse agudo e crônico na expressão do comportamento maternal em ratas lactantes**

Neste experimento foram avaliados os efeitos de diferentes condições de estresse (agudo e crônico) sobre o comportamento maternal em ratas lactantes.

#### **3.1 Grupos experimentais**

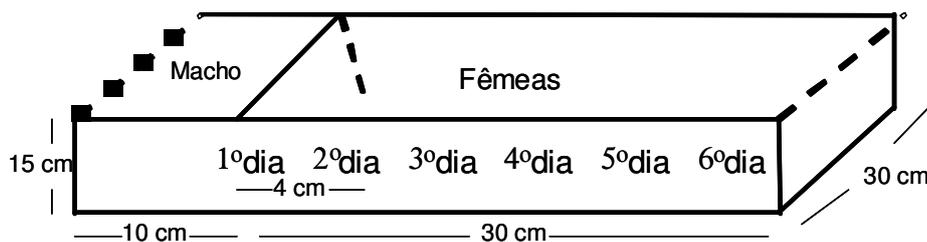
O dia do parto foi marcado como o 1º dia de lactação. No 2º dia de lactação o número de filhotes foi ajustado para 8 por rata. As ratas foram aleatoriamente divididas em 4 grupos experimentais:

- **Grupo C (controle não estressado, n=5)** – neste grupo as mães não foram manipuladas durante os primeiros dias de lactação, exceto para a limpeza das gaiolas. Os filhotes foram separados das mães 24h antes da realização do experimento. No dia do teste, 9º dia de lactação, as ratas foram colocadas com os filhotes na própria caixa e o comportamento maternal foi

filmado e analisado durante 1h.

- **Grupo E1 (estresse agudo, n=5)** – baseado em observações anteriores, em que a presença de um macho interfere com o comportamento maternal (Medeiros, 2004), as ratas deste grupo não foram manipuladas durante os primeiros dias de lactação e, no 9º dia pós-parto, as mães foram colocadas com os filhotes (separados 24h antes do experimento) em uma caixa, em um espaço de 30X30 cm, com um macho estranho (que não havia sido utilizado para o acasalamento), separado da fêmea e da ninhada por uma grade, em um espaço de 10X30 cm. O comportamento foi filmado e analisado por 1 h.

- **Grupo E2 (estresse crônico, n=5)** – pesquisas mostram que a instabilidade social (como a superpopulação e a presença de um intruso no meio) aumenta a concentração de corticosterona no plasma de fêmeas (Haller et al, 1998). Baseados nestas informações, decidimos usar um modelo de instabilidade social para verificar se este seria mais deletério para o comportamento maternal das lactantes do que o estresse social agudo utilizado em E1. Assim, as ratas deste grupo, no 3º dia de lactação, foram retiradas da sua caixa e colocadas junto com outra fêmea lactante em outra caixa (em um espaço de 30X30 cm) com um macho separado por uma grade (em um espaço de 10X30 cm). Os animais permaneceram neste ambiente por 2h, e retornaram à caixa original com os filhotes. As ratas foram estressadas durante seis dias consecutivos com a mesma fêmea, mas com alternância do macho estranho. A cada dia o espaço da caixa para as fêmeas era diminuído em 4 cm, conforme o esquema abaixo:



**Esquema 1:** Caixa experimental para a realização do estresse crônico durante 6 dias, do 3º ao 8º dia de lactação. Duas fêmeas foram colocadas no espaço para as fêmeas, separadas do macho por uma grade, e permaneceriam nesse ambiente durante duas horas. A cada dia de estresse, a grade era deslocada 4 cm, diminuindo o espaço das fêmeas na caixa.

No último dia do estresse, os filhotes foram separados das mães e no dia seguinte, 9º dia de lactação, foram colocados com as mães na própria caixa e o comportamento maternal foi filmado e analisado durante 1h.

- **Grupo E1+2 (estresse agudo+crônico, n=5)** - as ratas foram submetidas ao estresse crônico durante o período da lactação, conforme o item anterior. Para analisar se o estresse crônico poderia potencializar a interferência do estresse agudo no comportamento das mães, os filhotes foram separados no último dia do estresse crônico e um dia depois foram unidos às mães em uma caixa com a presença de um macho estranho, diferente do que foi utilizado durante o estresse crônico (ídem ao grupo E1) e o comportamento maternal foi filmado e analisado durante 1h.

### 3.2 Análise do comportamento maternal

No dia do teste, os filhotes foram distribuídos pela caixa e unidos à mãe. O comportamento da mãe foi filmado (câmara JVC, GR-SXM347) durante 1h e

gravado em fita VHS. Os parâmetros do comportamento, analisados com a ajuda do programa Etholog (versão 2.25), foram:

- Latência para o recolhimento de cada filhote ao ninho;
- Latência para o início da amamentação;
- Número de filhotes no ninho no início da amamentação;
- Tempo total em postura de amamentação durante o período do experimento;
- Tempo maternal, incluindo o tempo em que a rata permaneceu recolhendo os filhotes, construindo ninho e lambendo os filhotes;
- Tempo não maternal, tempo em que a rata permaneceu em outras atividades sem contato com os filhotes, como explorando o ambiente e realizando a auto-limpeza;

Foi analisado também o comportamento das ratas, minuto-a-minuto, durante os primeiros 10 min do experimento. Utilizaram-se apenas três dos parâmetros acima descritos:

- Tempo maternal;
- Tempo não maternal;
- Tempo de amamentação.

#### **4. Experimento 2: Participação da PAG no comportamento maternal em ratas lactantes normais ou submetidas a estresse agudo e crônico**

Quando neurônios recebem sinais extracelulares, "genes imediatos" como o proto-oncogene c-fos, começam a ser ativados. Acredita-se com isso que c-fos é uma marca de atividade neural (Stafisso-Sandoz e cols., 1997). Por isso a

detecção imunohistoquímica de Fos, o produto protéico do gene c-fos, tem sido usada para revelar a ativação neural no cérebro em resposta a estímulos comportamentais, tratamentos de drogas e respostas condicionadas.

#### **4.1 Perfusão**

Para determinar se a situação de estresse agudo e crônico ativaria a PAG, e qual coluna estaria envolvida, cinco ratas de cada grupo foram submetidas às mesmas condições ambientais do item 3.1 (C, E1, E2, e E1+2). Noventa minutos após o teste comportamental as ratas foram anestesiadas com Tiopental Sódico 40mg/Kg, via i.p. (Thionembatal, Laboratório Abbott) e forão perfundidas por via transcardíaca com solução de 4% de paraformaldeído em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,4.

Os cérebros foram removidos e mantidos de 12 a 24 h em solução de paraformaldeído 4%, sendo posteriormente transferidos para solução de sacarose 30% até a detecção imunohistoquímica.

#### **4.2 Microtomia**

Os cérebros foram fixados, com o auxílio de solução de *Tissue Freezing* no criostato de congelamento (Leica, CM 3050). Os cortes foram realizados a temperatura de -20°C.

Os cortes foram realizados no sentido coronal, com 40µm de espessura, em seis séries, da região caudal, aproximadamente -8,0 mm caudal ao Bregma (Paxinos e Watson, 1998) até a parte rostral da PAG, próximo à região caudal do

tálamo, aproximadamente -5,6 mm caudal ao Bregma (Paxinos e Watson, 1998).

### **4.3 Detecção imunohistoquímica de Fos**

Uma série completa de cortes foi processada para imunohistoquímica. Os cortes foram incubados durante 12h a temperatura ambiente com anticorpo primário contra Fos (IgG policlonal de coelho, Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:1000 em tampão fosfato (PBS, pH 7,4) contendo 0,3% Triton X-100 em 0,1M de tampão PBS. Os cortes foram lavados 3 vezes (10 min cada) com tampão PBS e incubados com o anticorpo secundário (anti-coelho IgG, H+L, Jackson Immuno Research) por 60 min.

Após três lavagens, os cortes foram posteriormente incubados durante 60 min com o complexo avidina-biotina (Biotin-SP-conjugado Affinity Pure burro, ABC Elite, Vector Laboratories). Após três lavagens o produto de imunorreação foi finalmente visualizado através de solução de diaminobenzidina 0,05% e peróxido de hidrogênio 0,01% em solução tampão PBS. Após a visualização da marcação marrom, aproximadamente 5 min depois, a reação foi interrompida com lavagens em solução tampão PBS.

Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e secados por 48h em placa quente. Para cada animal foram montadas lâminas contendo seis cortes rostro-caudais. Após secas, as lâminas foram coradas com tetróxido de ósmio (Anexo A) para aumentar a visibilidade do produto de reação.

Uma segunda série de cortes foi processada para coloração com Giemsa (Anexo B) para a visualização das células e divisão das colunas da PAG.

As células imunorreativas para Fos foram visualizadas em objetiva de 10X no microscópio Nikon Eclipse E600 equipado com câmera lúcida. Para a célula ser considerada como expressando Fos, os núcleos dos neurônios deviam apresentar a forma redonda ou oval, mostrando uma coloração escura do complexo precipitado. A região da PAG foi dividida nas colunas dorsal, dorsolateral e lateral, segundo descrito por Bandler et al. (1991), e posteriormente citado por Comoli et al. (2003) para a contagem de núcleos expressando Fos imunoreativos na PAG. Para a divisão das colunas foi utilizado o atlas neuroanatômico de Paxinos e Watson (1998). Para cada animal foi contado o número de células expressando Fos em cada coluna da PAG dos seis segmentos rostro-caudais.

## **5. Experimento 3: Efeito da microinjeção de antagonistas opióides na PAGI no comportamento maternal em ratas lactantes normais ou submetidas a estresse agudo e crônico.**

### **5.1 Cirurgia estereotáxica**

Aproximadamente sete dias antes do parto, as ratas foram submetidas à cirurgia estereotáxica para implantação unilateral de cânulas-guias na PAGI.

As cânulas foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (G25), com 0,6mm de diâmetro e 12mm de comprimento. Os animais foram anestesiados com Tiopental Sódico 35mg/Kg i.p. (Thionembutal, Laboratório Abbott) e Cloridrato de Xilazina 10mg/Kg i.m. (Virbaxil, Laboratório Virbac). As ratas foram fixadas em aparelho estereotáxico (Insight Equipamentos). A calota

craniana foi exposta pela remoção da pele e a região foi raspada e seca para garantir a adesão do acrílico autopolimerizante (Policron). As coordenadas utilizadas foram baseadas no Atlas de Paxinos e Watson (1998):

Antero-posterior: 6,0 mm posterior ao bregma

Lateral: 1,5 mm à direita da linha média

Ângulo: 10° à direita da linha média

Ventral: 2,7 mm ventrais à superfície óssea

Este ponto fica a 3 mm acima da PAGI. A calota craniana foi perfurada com o auxílio de uma broca de 1 mm (Insight Equipamentos). Após a implantação da cânula, foram fixados dois miniparafusos de níquel/prata (218) e a calota craniana foi coberta com acrílico autopolimerizante. Um pequeno estilete, medindo 15 mm de comprimento, obtido a partir de agulha G30 (Becton Dickinson) foi inserido na cânula e fixado no capacete com acrílico. Minutos antes da microinjeção o estilete foi retirado com o auxílio de um alicate.

As ratas foram monitoradas até o momento do parto. Após o nascimento dos filhotes, as mães foram submetidas às mesmas condições ambientais do ítem 3.1.

## 5.2 Tratamentos

Foram administradas as seguintes drogas na PAGI:

- Naltrexona: antagonista opióide não seletivo (Sigma), na concentração de 2,5 µg/0,5µl (12,08 mmol/l) (Miranda-Paiva et al, 2003);
- Nor-binaltorfimina (nor-BNI): antagonista opióide específico de receptores κ (Tocris), na concentração de 4,0 µg/0,5µl (10,50 mmol/l)

(Medeiros, 2004);

- Naloxonazina: antagonista opióide específico de receptores  $\mu 1$  (Tocris), na concentração de 5,0  $\mu\text{g}/0,5\mu\text{l}$  (13,48 mmol/l) (Medeiros, 2004).

Um grupo recebeu 0,5  $\mu\text{l}$  de solução salina (NaCl 0,9%).

### 5.3 Microinjeção

Antes do início do teste comportamental, no 9º dia de lactação, as ratas foram divididas aleatoriamente em grupos para receberem naltrexona ou antagonistas seletivos (nor-BNI e naloxonazina) conforme a tabela abaixo:

Grupos Experimentais	Microinjeção	Número de Animais
Grupo Cs	Salina	8
Grupo E1s	Salina	8
Grupo E2s	Salina	8
Grupo E1+2s	Salina	8
Grupo Cn	Naltrexona	7
Grupo E1n	Naltrexona	7
Grupo E2n	Naltrexona	8
Grupo E1+2n	Naltrexona	8
Grupo Cb	Nor-BNI	8
Grupo E1b	Nor-BNI	7
Grupo E2b	Nor-BNI	7
Grupo E1+2b	Nor-BNI	7
Grupo Cz	Naloxonazina	8
Grupo E1z	Naloxonazina	8
Grupo E2z	Naloxonazina	8
Grupo E1+2z	Naloxonazina	9

A microinjeção na cânula-guia foi realizada por meio de uma agulha injetora (G30, Becton Dickinson) com 15 mm de comprimento, conectada a um tubo de polietileno (PE 10) e este a uma microseringa (Hamilton) de 5  $\mu$ l. O volume microinjetado foi de 0,5  $\mu$ l durante um período de 30 s. A agulha injetora permaneceu outros 30 s na cânula antes de ser retirada.

O teste comportamental foi realizado 10 min após a microinjeção. Os parâmetros do comportamento foram os mesmos que no ítem 3.2.

Imediatamente após o experimento, as ratas foram sacrificadas por decapitação em uma guilhotina (Insight Equipamentos). Na cânula guia foi microinjetado 0,5  $\mu$ l de solução 0,3% de Azul de Evans para a visualização do ponto da microinjeção. Os cérebros foram retirados e armazenados em solução de formalina 10% até a análise histológica.

#### **5.4 Histologia**

Um dia antes da histologia os cérebros foram criopreservados em solução de sacarose 30%. Os cérebros foram fixados e seccionados em vibrótomo (Campden, VSLM 1). Foram realizados cortes de 100  $\mu$ m na região da PAG, onde era possível visualizar as marcas da microinjeção (mancha do Azul de Evans). Os cortes foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas e permaneceram secando durante 1 semana, para então serem coradas pelo método de Nissl (Anexo C). As lâminas foram observadas em microscópio óptico para verificar o local da microinjeção. Foram considerados apenas os animais em que o alvo foi atingido.

## 6. Análise estatística

Foram utilizados testes estatísticos do programa Statistica, versão 5,0, para verificar as diferenças entre os tratamentos. Os resultados do comportamento maternal foram analisados através do teste ANOVA de 1 e 2 vias, com *post hoc* de Duncan. Quando necessário (progresso do recolhimento dos filhotes e análise do comportamento minuto-a-minuto) foi utilizado o teste ANOVA com repetição. Para a análise do número de células que expressam Fos foi utilizado o teste ANOVA de 2 vias, onde a variável dependente foi o número de células imunorreativas para Fos em cada coluna da PAG a cada nível rostro-caudal.

As diferenças entre os grupos e os tratamentos foram consideradas significativas para valores de  $p \leq 0,05$ . Os resultados foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. Os valores de F (obtido através do teste ANOVA) foram indicados nos resultados.

## RESULTADOS

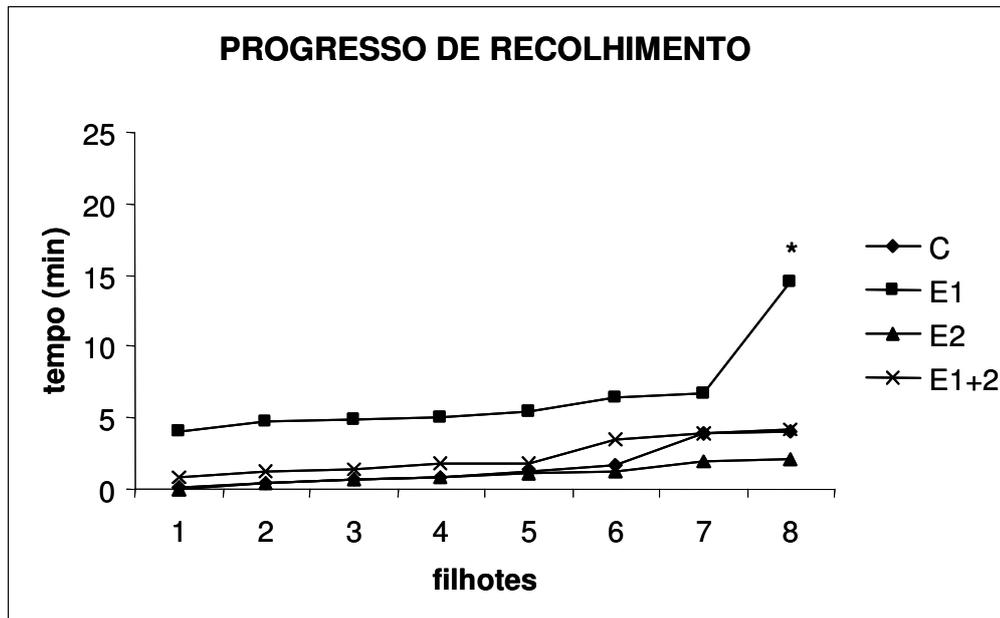
## 1. Experimento 1: Efeito do estresse agudo e crônico na expressão do comportamento maternal em ratas lactantes

### 1.1 Progresso de Recolhimento

Após o período de separação entre as mães e os filhotes, a união das ratas lactantes com a ninhada foi caracterizada pela expressão do comportamento maternal. As ratas recolheram todos os filhotes ao ninho, construíram o ninho com a serragem e, após o agrupamento, as mães posicionaram-se sobre os filhotes para iniciar a amamentação.

Neste experimento, as ratas controle, que não foram submetidas a nenhuma condição de estresse durante a lactação, demoraram em média ( $\pm$  e.p.m.)  $4,0 \pm 2,6$  min para recolher todos os filhotes ao ninho antes de iniciar a amamentação. Ratas submetidas a condição de estresse agudo demoraram  $14,5 \pm 6,9$  min para recolher todos os filhotes. Este grupo levou significativamente mais tempo para recolher os filhotes, comparado ao grupo controle ( $F_{(3,14)}=7,30$ ,  $p=0,003$ , *post hoc* de Duncan:  $p=0,002$ ) (Fig. 1).

Os grupos submetidos a estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2) não apresentaram diferenças no progresso de recolhimento comparados ao controle.

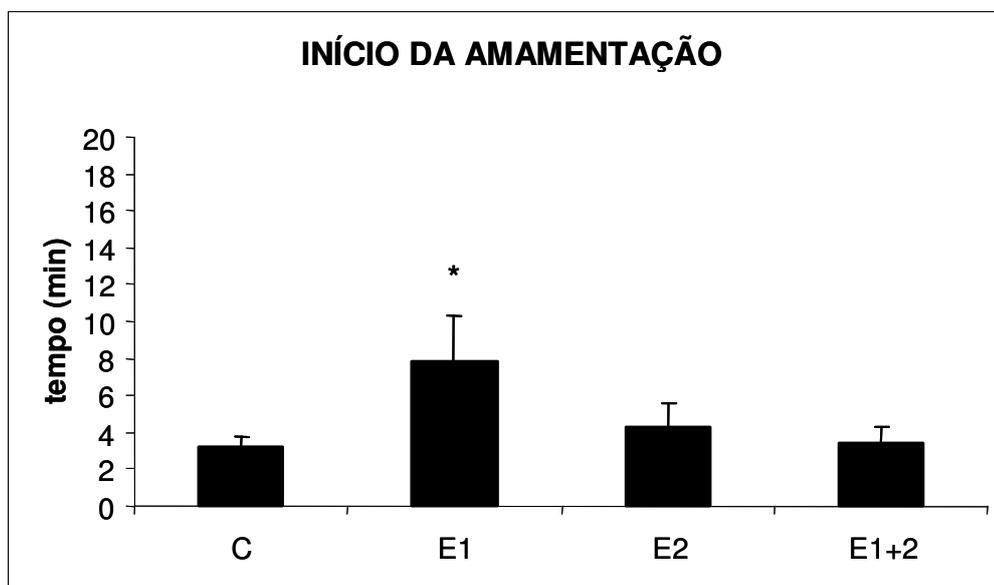


**Figura 1:** Efeito do estresse agudo e crônico no tempo de recolhimento de cada filhote ao ninho (média). (\*) diferença entre E1 e C no progresso de recolhimento (ANOVA com repetição:  $F_{(3,14)}=7,30$ ,  $p=0,003$ ). Controle não estressado (C), estresse agudo (E1), estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2).

## 1.2 Início da Amamentação

Ratas controle (grupo C) iniciaram a amamentação antes de recolher todos os filhotes, em  $3,2 \pm 0,5$  min após o início do experimento. Ratas submetidas a estresse agudo (grupo E1) demoraram mais para iniciar a amamentação ( $F_{(3,14)}=3,08$ ,  $p=0,05$ ) em relação ao grupo C ( $7,8 \pm 2,4$  min, *post hoc* de Duncan:  $p=0,02$ ) (Fig. 2) Este grupo também iniciou a amamentação antes de recolher todos os filhotes ao ninho.

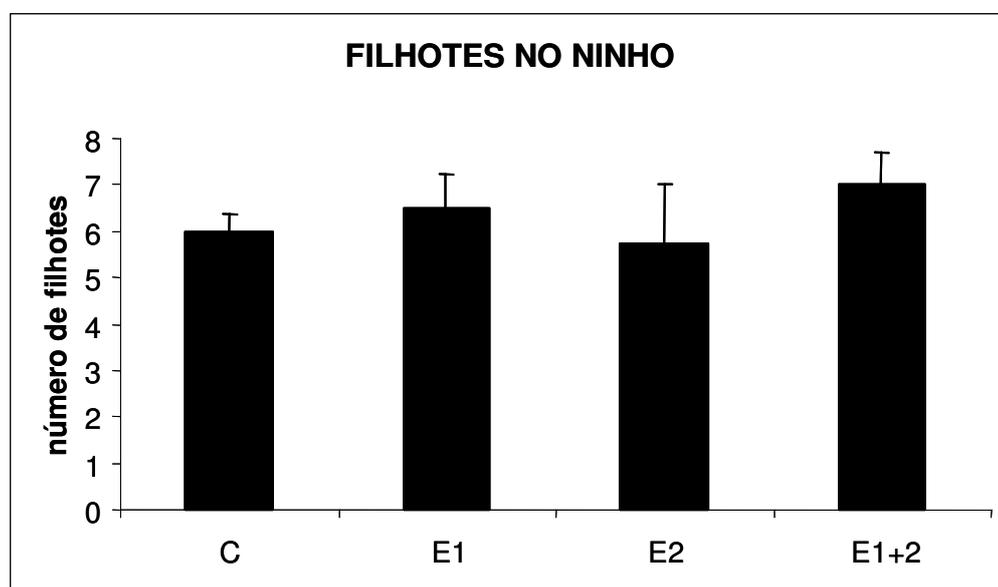
Os grupos E2 e E1+2 não apresentaram diferenças significativas no início da amamentação em relação ao grupo C.



**Figura 2:** Efeito do estresse agudo e crônico na latência para o início da amamentação (média + e.p.m). (\*) diferença entre E1 e C (ANOVA:  $F_{(3,14)}=3,08$ ,  $p=0,05$ ). Controle não estressado (C), estresse agudo (E1), estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2).

### 1.3 Filhotes no Ninho

No início da amamentação, as ratas do grupo controle tinham em média  $6,0 \pm 0,3$  filhotes no ninho do total dos 8 filhotes. Não foram encontradas diferenças significativas no número de filhotes no ninho nos grupos submetidos a estresse agudo e crônico ( $F_{(3,14)}=0,66$ ,  $p=0,58$ ) (Fig. 3).

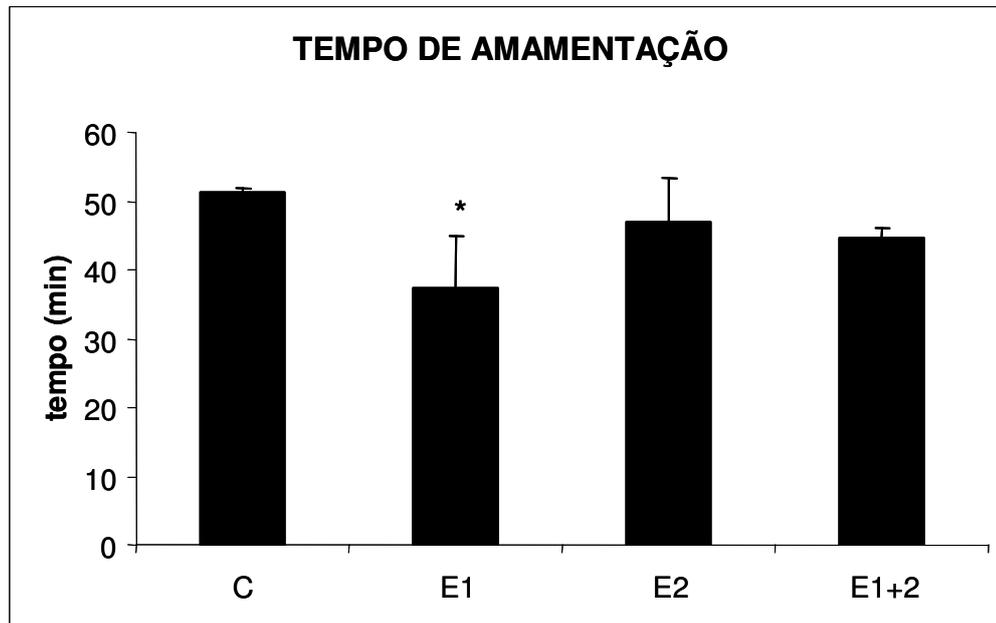


**Figura 3:** Efeito do estresse agudo e crônico no número de filhotes presente no ninho no início da amamentação (média + e.p.m.) (ANOVA:  $F_{(3,14)}=0,66$ ,  $p=0,58$ ). Controle não estressado (C), estresse agudo (E1), estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2).

#### 1.4 Tempo de Amamentação

O tempo de amamentação é caracterizado pela postura de cifose sobre os filhotes, facilitando o acesso aos mamilos e estimulando o processo de sucção pelos filhotes. As ratas do grupo controle permaneceram  $51,1 \pm 0,6$  min em postura de amamentação. As ratas submetidas a estresse agudo (grupo E1) permaneceram menos tempo amamentando os filhotes comparadas às ratas do grupo C ( $37,4 \pm 7,5$  min,  $p=0,03$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,03$ ) (Fig. 4).

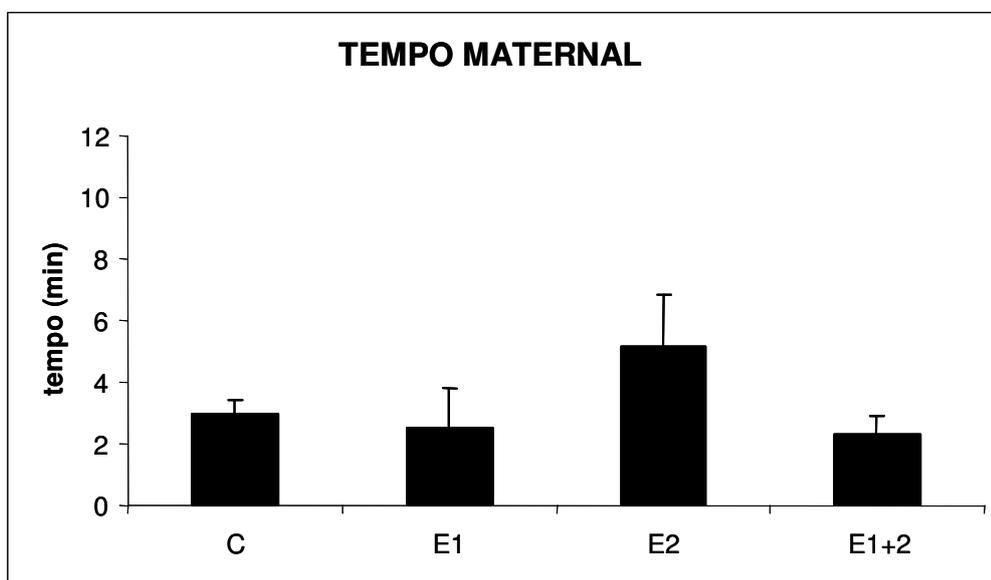
Não houve diferenças significativas no tempo total de amamentação para as ratas submetidas a estresse crônico e estresse agudo+crônico em relação às ratas controle ( $F_{(3,14)}=2,24$ ,  $p=0,12$ ).



**Figura 4:** Efeito do estresse agudo e crônico no tempo em que a rata permanece em postura de amamentação (média + e.p.m). (ANOVA:  $F_{(3,14)}=2,24$ ,  $p=0,12$ ). (\*) diferença entre E1 e C no tempo total de amamentação (*post hoc* de Duncan,  $p=0,03$ ). Controle não estressado (C), estresse agudo (E1), estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2).

## 1.5 Tempo Maternal

O tempo maternal é caracterizado pelo comportamento de recolhimento dos filhotes, agrupamento no ninho, limpeza e construção de ninho. As ratas do grupo controle permaneceram  $2,9 \pm 0,4$  min em comportamento maternal. Não houve diferenças significativas entre os grupos estressados ( $F_{(3,14)}=1,03$ ,  $p=0,40$ ) (Fig. 5).

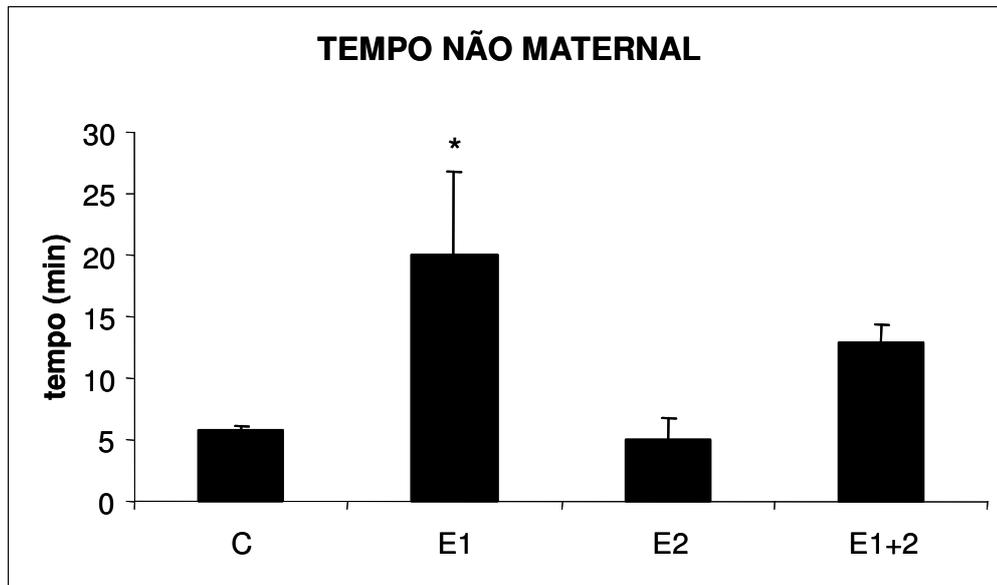


**Figura 5:** Efeito do estresse agudo e crônico no tempo em que a rata permanece em atividade maternal ao longo do experimento (média + e.p.m.) (ANOVA:  $F_{(3,14)}=2,04$ ,  $p=0,15$ ). Controle não estressado (C), estresse agudo (E1), estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2).

## 1.6 Tempo Não Maternal

O tempo não maternal é caracterizado por atividades de exploração da caixa, auto-limpeza e exploração vertical. As ratas do grupo controle passaram  $5,8 \pm 0,2$  min em atividades não maternais ao longo do experimento. Ratas do grupo E1 passaram mais tempo em atividades não maternais comparado com o grupo controle ( $F_{(3,14)}=6,05$ ,  $p=0,007$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,003$ ) (Fig. 6).

As ratas submetidas a estresse crônico e estresse agudo+crônico não apresentaram diferenças significativas no tempo não maternal total em relação as ratas do grupo controle.



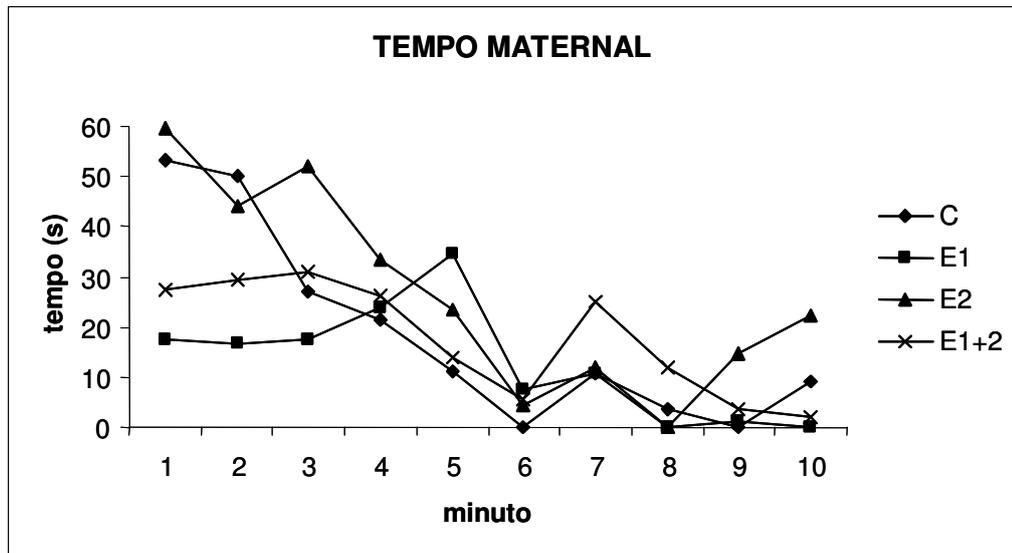
**Figura 6:** Efeito do estresse agudo e crônico no tempo em que a rata permanece em comportamento não maternal (média + e.p.m). (\*) diferença entre E1 e C (ANOVA:  $F_{(3,14)}=6,05$ ,  $p=0,007$ ). Controle não estressado (C), estresse agudo (E1), estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2).

## **1.7 Análise minuto-a-minuto**

A análise minuto-a-minuto foi realizada durante os primeiros 10 min do experimento. Esta análise foi utilizada para verificar se as diferenças encontradas no tempo maternal, não maternal e de amamentação durante o experimento foram mais pronunciadas nos primeiros minutos do contato das mães com os filhotes

### **1.7.1 Tempo Maternal**

A análise minuto-a-minuto durante os primeiros 10 min de experimento revelou que o tempo maternal diminuiu ao longo do tempo para as ratas do grupo controle (Fig. 7). Este grupo passou  $53,4 \pm 4,5$  s durante o primeiro minuto em atividades maternas, e  $9,3 \pm 10,4$  s no último minuto. Não foram encontradas diferenças significativas no progresso do tempo maternal durante os primeiros minutos entre os grupos submetidos a estresse agudo e crônico comparados às ratas controle ( $F_{(3,14)}=2,23$ ,  $p=0,12$ ).

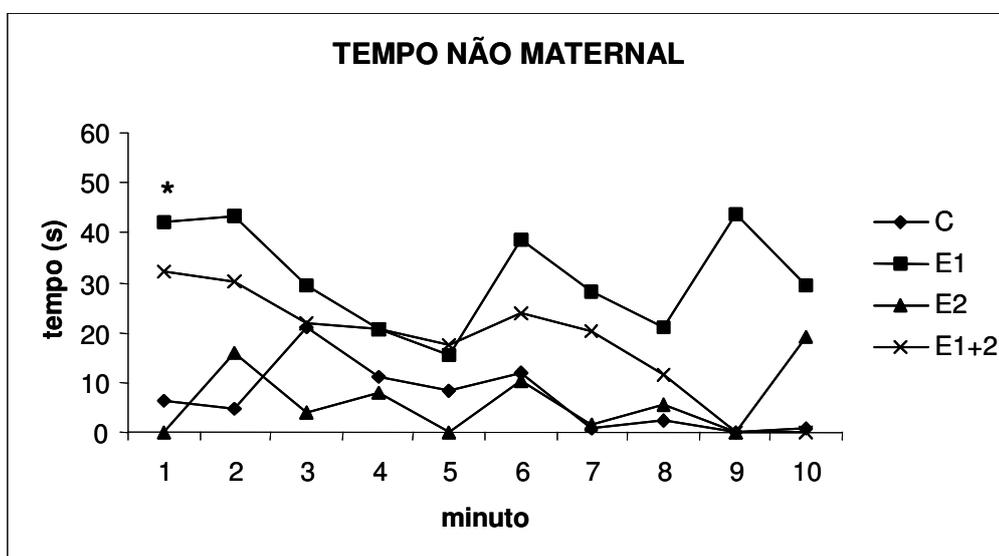


**Figura 7:** Efeito do estresse agudo e crônico no tempo maternal durante os 10 primeiros min (média). (ANOVA com repetição:  $F_{(3,14)}=2,23$ ,  $p=0,12$ ). Controle não estressado (C), estresse agudo (E1), estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2).

### 1.7.2 Tempo Não Maternal

O tempo em que as ratas controle permaneceram em atividades não maternais durante o primeiro minuto foi de  $6,4 \pm 4,5$  s. Houve diferenças significativas no tempo não maternal das ratas submetidas a estresse agudo em relação às ratas do grupo C ( $F_{(3,14)}=7,33$ ,  $p=0,003$ ) (Fig. 8). Ratas submetidas a estresse agudo passaram mais tempo em atividades não maternais que as ratas controle (*post hoc* de Duncan,  $p=0,001$ ).

As ratas que foram submetidas a estresse crônico e estresse agudo+crônico não apresentaram diferenças significativas no tempo não maternal durante os primeiros minutos comparadas às ratas controle.

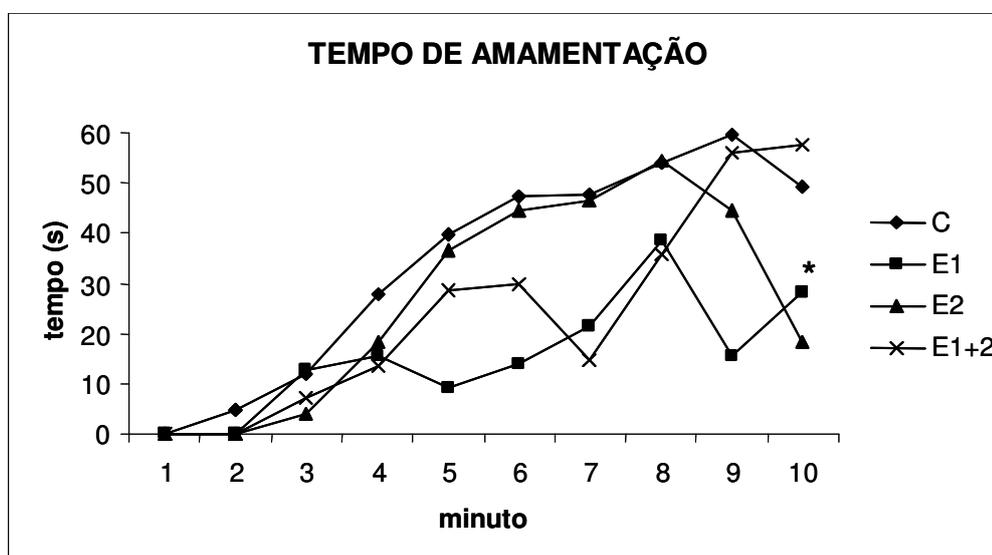


**Figura 8:** Efeito do estresse agudo e crônico no tempo não maternal durante os 10 primeiros minutos (média). (\*) diferença entre E1 e C (ANOVA com repetição:  $F_{(3,14)}=7,33$ ,  $p=0,003$ ). Controle não estressado (C), estresse agudo (E1), estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2).

### 1.7.3 Tempo de Amamentação

O tempo que as ratas permaneceram em postura de amamentação aumentou ao longo dos primeiros 10 minutos (Fig. 9). Ratas do grupo controle passaram  $49,2 \pm 11,2$  s no último minuto amamentando seus filhotes. Ratas do grupo E1 apresentaram diferenças significativas no tempo de amamentação em relação ao grupo controle, permanecendo menos tempo em postura de amamentação ( $F_{(9,126)}=13,54$ ,  $p=0,0001$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,03$ ). No último minuto, as ratas do grupo E1 passaram  $28,0 \pm 18,8$  s amamentando seus filhotes.

Os grupos E2 e E1+2 não apresentaram diferenças significativas no tempo de amamentação em relação ao grupo controle.



**Figura 9:** Efeito do estresse agudo e crônico no tempo de amamentação durante os 10 primeiros min (média). (\*) diferença entre E1 e C (ANOVA com repetição:  $F_{(9,126)}=13,54$ ,  $p=0,0001$ ). Controle não estressado (C), estresse agudo (E1), estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2).

## 2. Experimento 2: Participação da PAG no comportamento maternal em ratas lactantes normais ou submetidas a estresse agudo e crônico

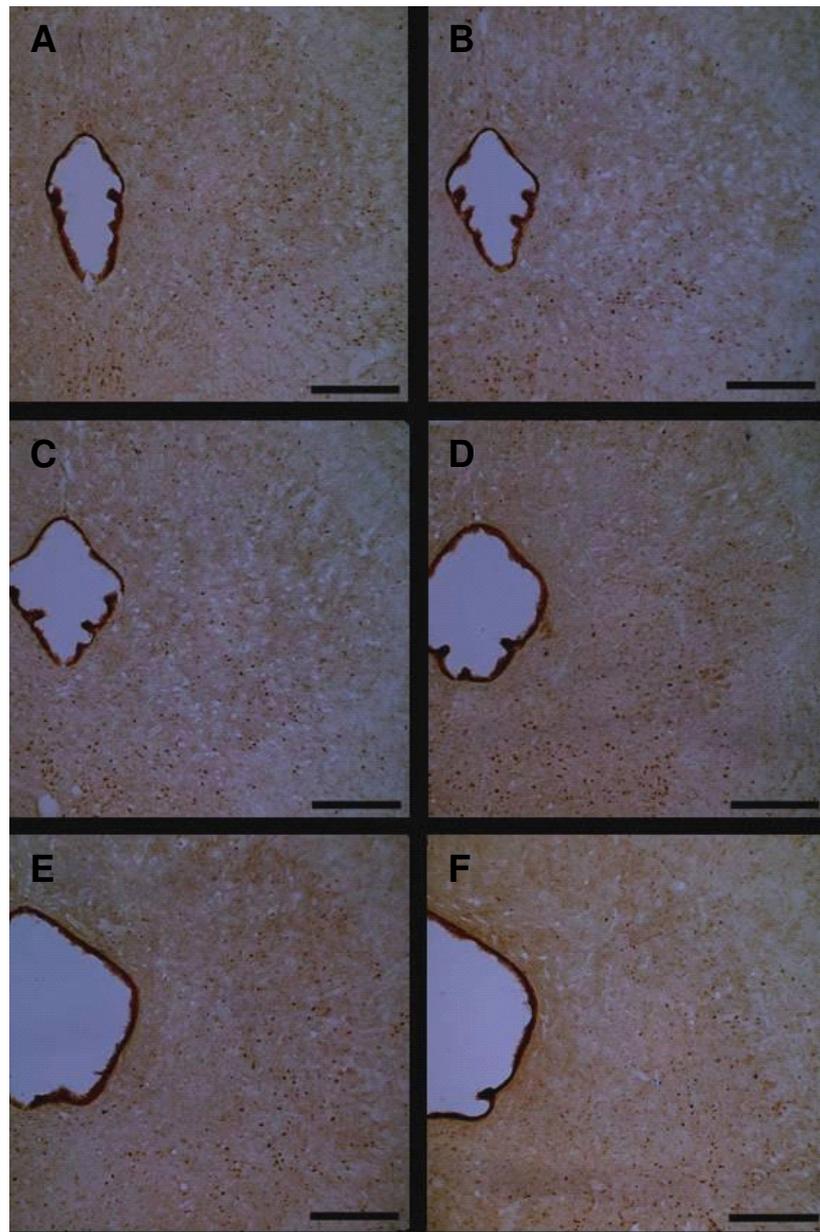
A detecção imunohistoquímica de Fos foi realizada em seis níveis da PAG de (A), região rostral, aproximadamente -5,6 mm caudal ao Bregma, até (F), região caudal, aproximadamente -7,6 mm caudal ao Bregma, segundo as coordenadas de Paxinos e Watson (1998). A contagem foi realizada em câmera lúcida e revelou um padrão uniforme de expressão de Fos nos diferentes níveis rostro-caudais nos animais controle (Fig. 10 e 11).

Ratas que foram submetidas a estresse agudo (grupo E1) apresentaram um aumento no número de células expressando Fos na coluna lateral, em todos os níveis da PAG ( $F_{(3,10)}=10,33$ ,  $p\leq 0,002$ ) comparadas ao grupo controle (Fig. 12 e 13) (A, grupo C:  $97,7 \pm 16,3$  e grupo E1:  $165,0 \pm 19,1$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,02$ ; B, grupo C:  $66,2 \pm 6,5$  e grupo E1:  $210,5 \pm 32,4$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,0003$ ; C, grupo C:  $65,2 \pm 5,8$  e grupo E1:  $178,5 \pm 14,5$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,0001$ ; D, grupo C:  $69,0 \pm 3,9$  e grupo E1:  $171,0 \pm 25,7$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,0004$ ; E, grupo C:  $70,7 \pm 7,7$  e grupo E1:  $176,2 \pm 20,0$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,0002$ ; F, grupo C:  $70,7 \pm 5,6$  e grupo E1:  $167,2 \pm 10,2$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,0001$ ).

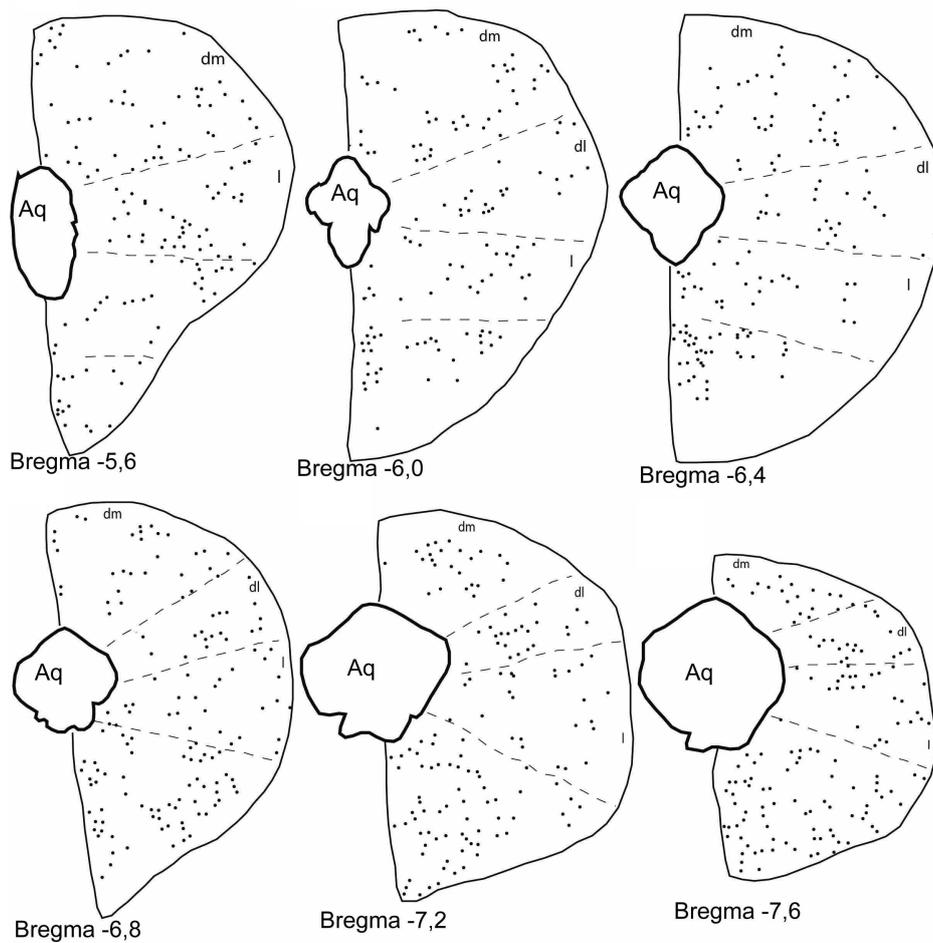
Ratas submetidas a estresse crônico apresentaram diminuição na expressão de Fos na coluna dorsomedial, nos três primeiros níveis rostrais da PAG, comparado com o controle ( $F_{(3,10)}=9,02$ ,  $p\leq 0,003$ ) (Fig. 14 e 15) (A, C:  $102,5 \pm 14,1$  e E2:  $62,6 \pm 11,2$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,02$ ; B, C:  $87,7 \pm 12,8$  e E2:  $46,6 \pm 6,3$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,004$ ; C, C:  $81,0 \pm 6,9$  e E2:  $44,3 \pm 3,1$ , *post*

*hoc* de Duncan,  $p=0,01$ ). E diminuição na coluna dorsolateral nos dois últimos níveis caudais ( $F_{(3,10)}=34,92$ ,  $p\leq 0,03$ ) (E, C:  $38,7 \pm 3,4$  e E2:  $24,0 \pm 7,4$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,03$ ; F, C:  $39,5 \pm 4,2$  e E2:  $19,0 \pm 3,9$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,01$ ).

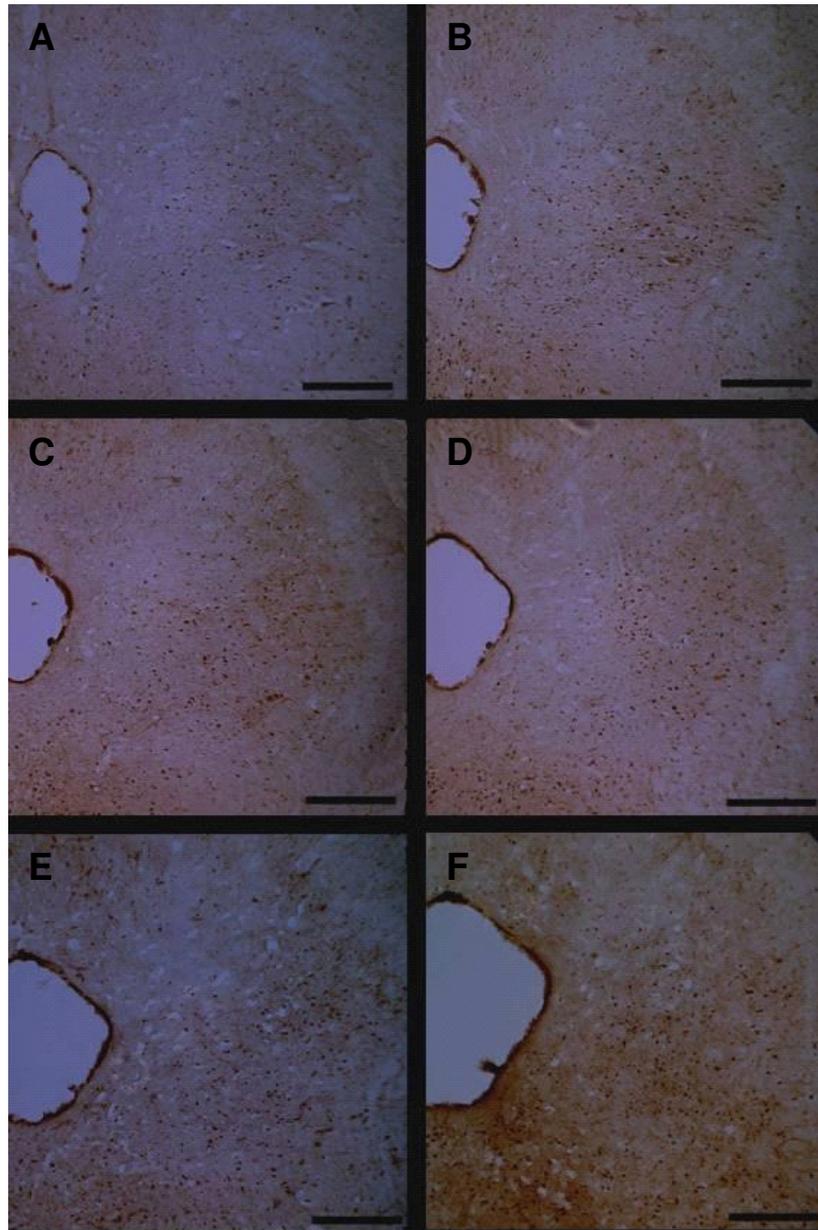
O grupo submetido a estresse agudo+crônico não apresentou diferenças significativas na expressão de Fos nos primeiros cinco níveis analisados (Fig. 16 e 17). Entretanto, houve diminuição significativa de Fos na região dorsolateral no último nível comparado com o controle (F, C:  $39,5 \pm 4,2$  e E1+2:  $21,3 \pm 4,0$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,03$ ).



**Figura 10:** Fotomicrografias de cortes expressando Fos de uma rata do grupo C em seis níveis da PAG de (A), região rostral, aproximadamente -5,6 mm caudal ao Bregma, até (F), região caudal, aproximadamente -7,6 mm caudal ao Bregma, segundo as coordenadas de Paxinos e Watson (1998). Os cortes foram corados com tetróxido de ósmio para melhorar a visibilidade da marcação de Fos. Barra de escala 300  $\mu$ m.



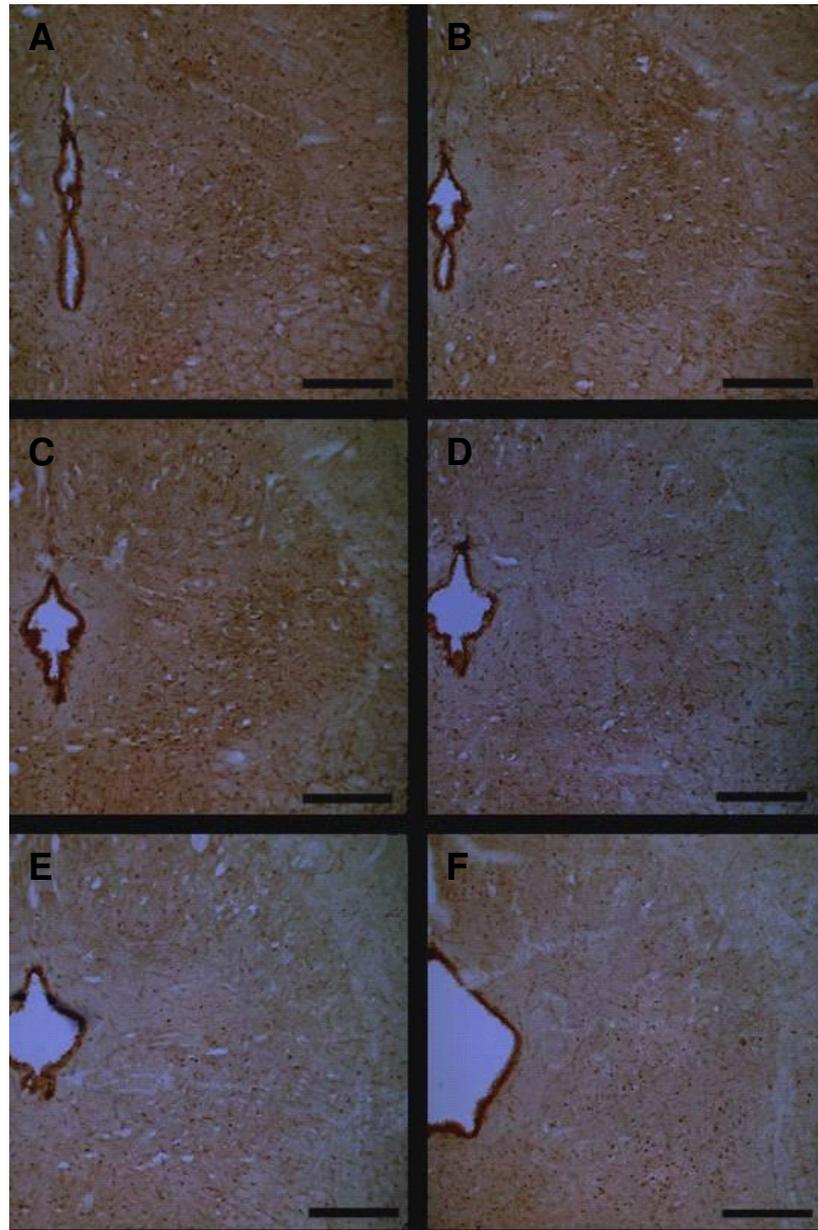
**Figura 11:** Imagens montadas em câmara lúcida mostrando a localização de células expressando Fos em uma rata controle. A contagem foi realizada em seis níveis rostro (Bregma -5,6 mm) caudal (Bregma -7,6 mm) segundo Paxinos e Watson (1998). A PAG foi dividida em 3 colunas, dorsomedial (dm), dorsolateral (dl) e lateral (l). Aq representa o aqueduto.



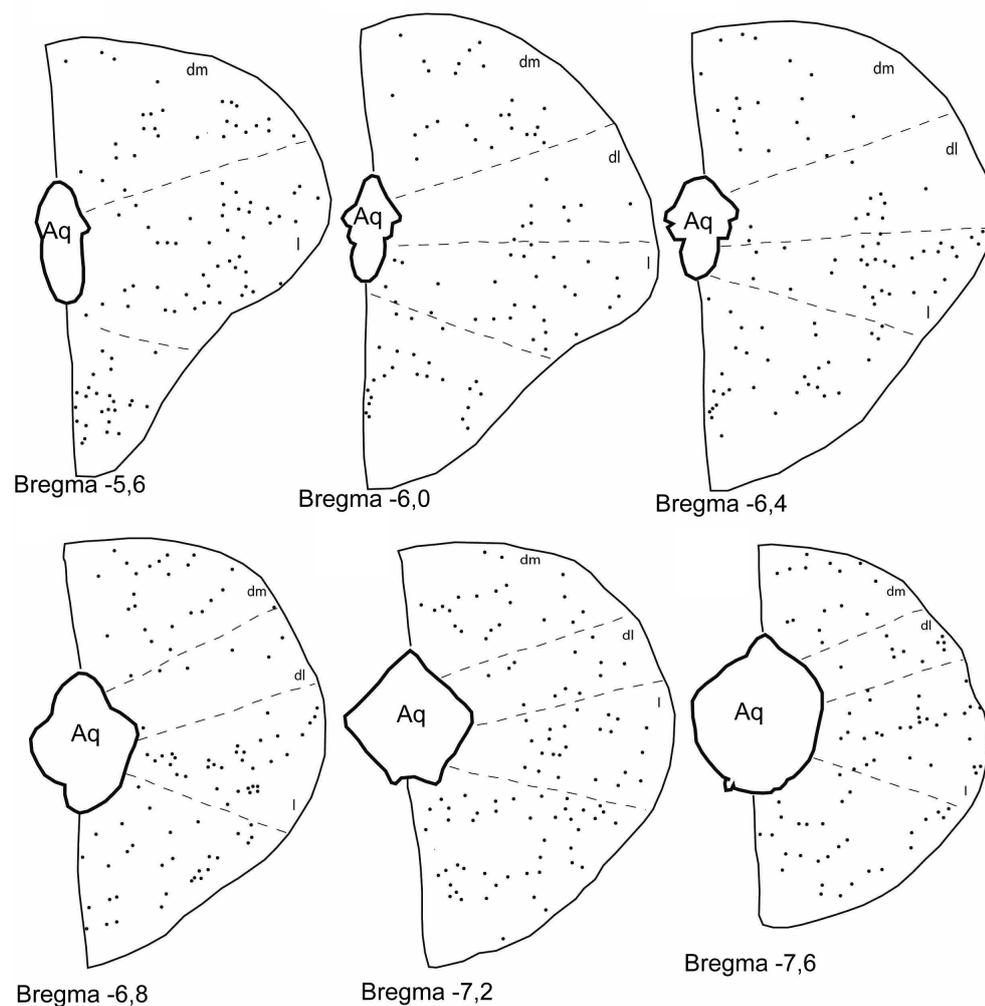
**Figura 12:** Fotomicrografias de cortes expressando Fos de uma rata do grupo E1 em seis níveis da PAG de (A), região rostral, aproximadamente -5,6 mm caudal ao Bregma, até (F), região caudal, aproximadamente -7,6 mm caudal ao Bregma, segundo as coordenadas de Paxinos e Watson (1998). Os cortes foram corados com tetróxido de ósmio para melhorar a visibilidade da marcação de Fos. Barra de escala 300  $\mu$ m.



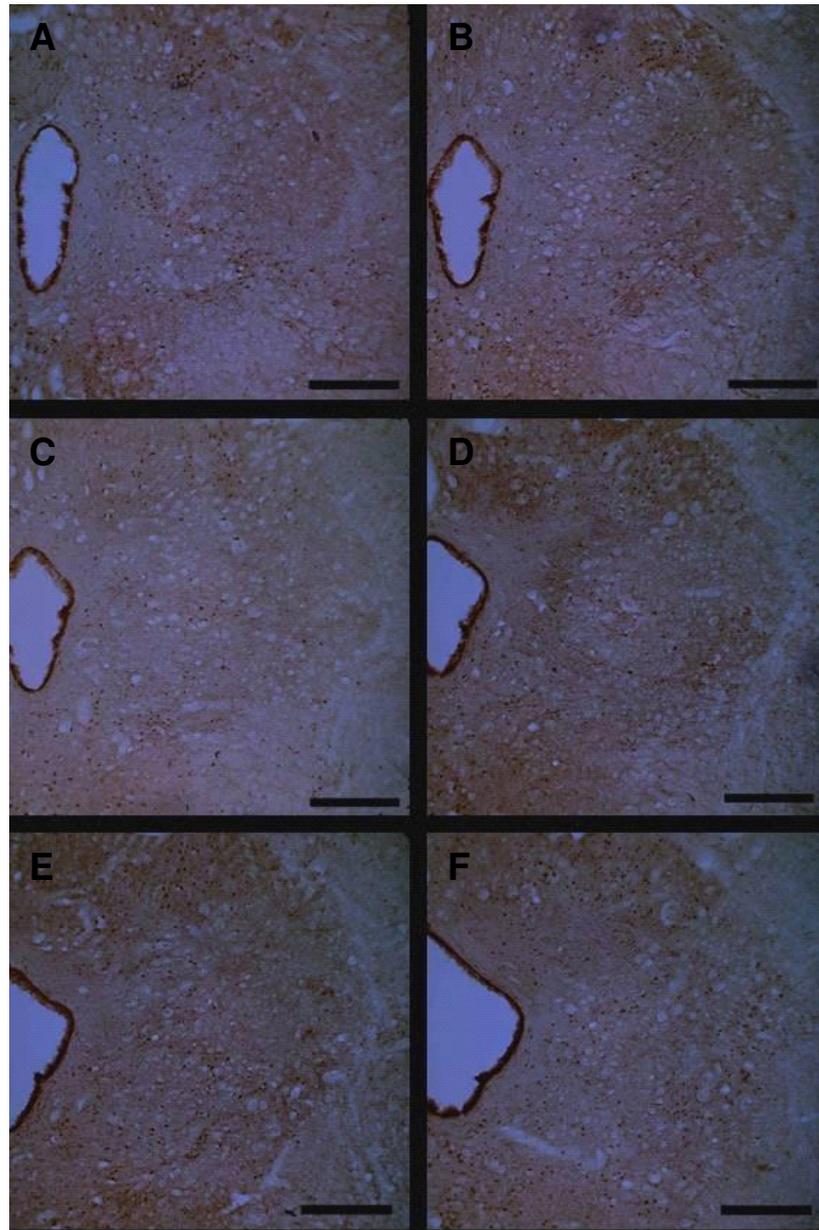
**Figura 13:** Imagens montadas em câmara lúcida mostrando a localização de células expressando Fos em uma rata submetida a estresse agudo. A contagem foi realizada em seis níveis rostral (Bregma -5,6 mm) caudal (Bregma -7,6 mm) segundo Paxinos e Watson (1998). A PAG foi dividida em 3 colunas, dorsomedial (dm), dorsolateral (dl) e lateral (l). Aq representa o aqueduto.



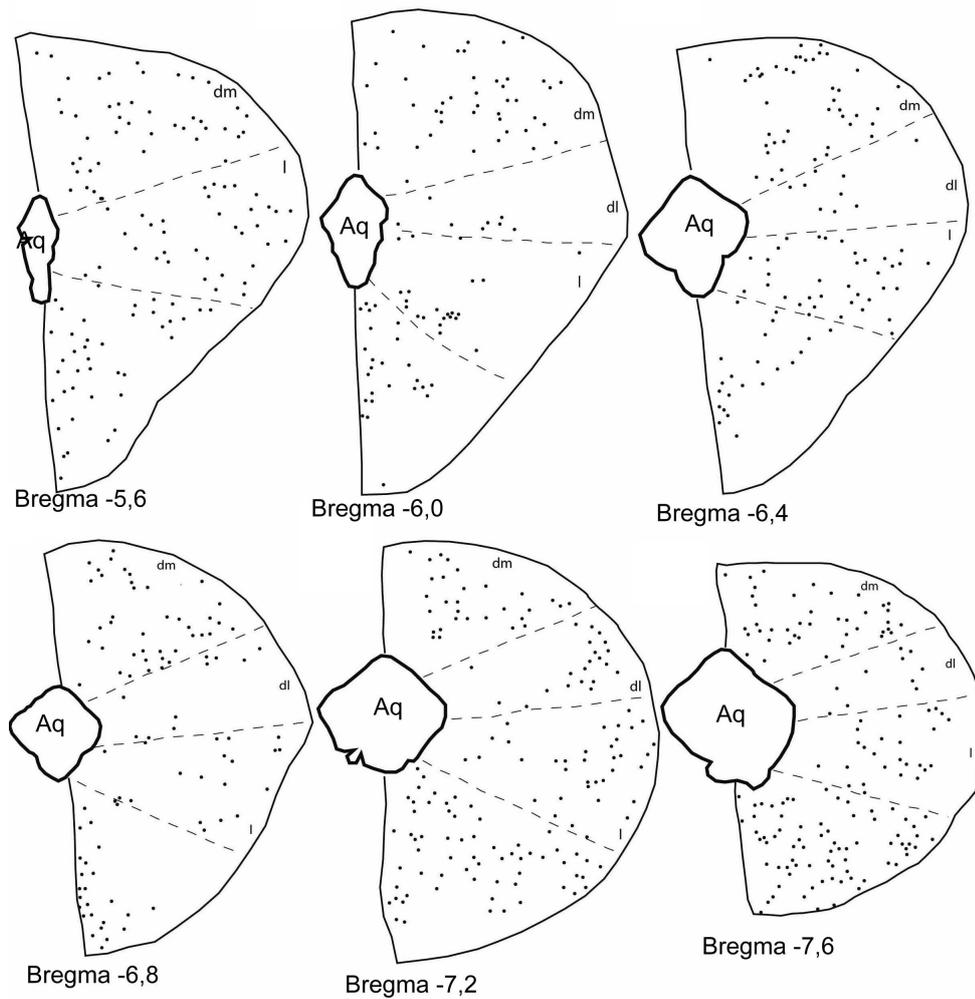
**Figura 14:** Fotomicrografias de cortes expressando Fos de uma rata do grupo E2 em seis níveis da PAG de (A), região rostral, aproximadamente -5,6 mm caudal ao Bregma, até (F), região caudal, aproximadamente -7,6 mm caudal ao Bregma, segundo as coordenadas de Paxinos e Watson (1998). Os cortes foram corados com tetróxido de ósmio para melhorar a visibilidade da marcação de Fos. Barra de escala 300  $\mu$ m.



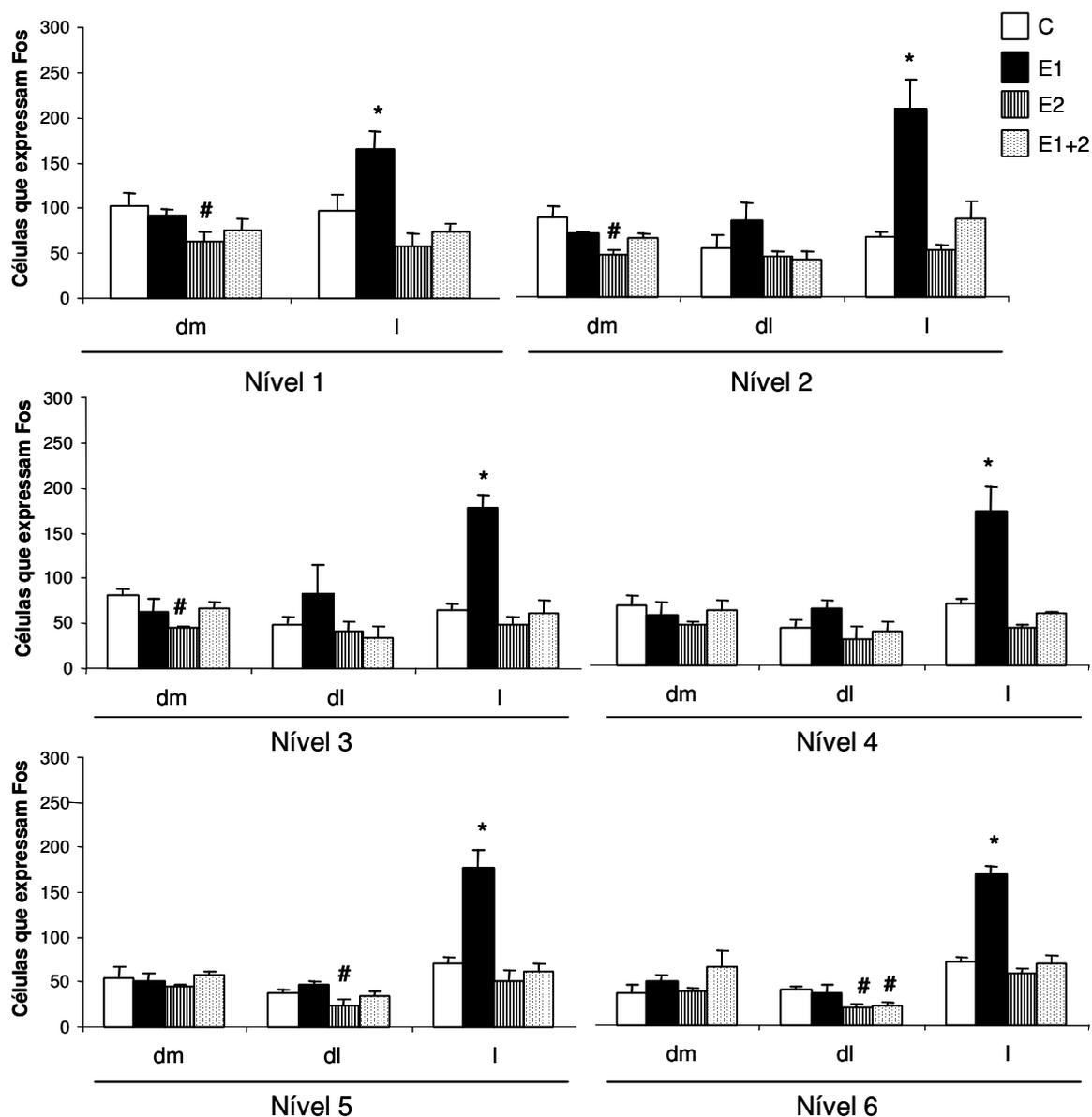
**Figura 15:** Imagens montadas em câmara lúcida mostrando a localização de células expressando Fos em uma rato submetida a estresse crônico. A contagem foi realizada em seis níveis rostro (Bregma -5,6 mm) caudal (Bregma -7,6 mm) segundo Paxinos e Watson (1998). A PAG foi dividida em 3 colunas, dorsomedial (dm), dorsolateral (dl) e lateral (l). Aq representa o aqueduto.



**Figura 16:** Fotomicrografias de cortes expressando Fos de uma rata do grupo E1+2 em seis níveis da PAG de (A), região rostral, aproximadamente -5,6 mm caudal ao Bregma, até (F), região caudal, aproximadamente -7,6 mm caudal ao Bregma, segundo as coordenadas de Paxinos e Watson (1998). Os cortes foram corados com tetróxido de ósmio para melhorar a visibilidade da marcação de Fos. Barra de escala 300  $\mu$ m.



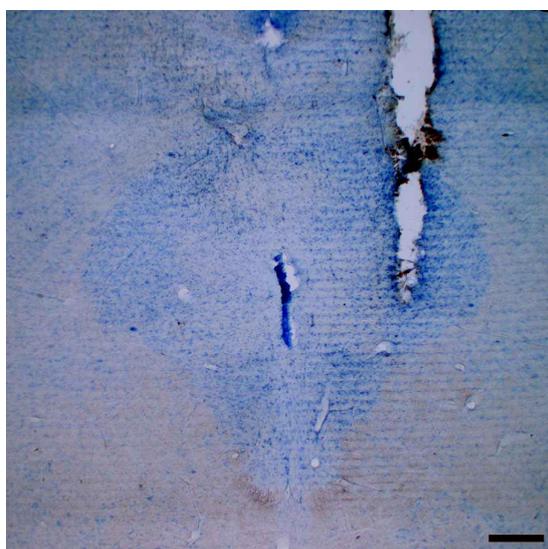
**Figura 17:** Imagens montadas em câmara lúcida mostrando a localização de células expressando Fos em uma rata submetida a estresse agudo+crônico. A contagem foi realizada em seis níveis rostro (Bregma -5,6 mm) caudal (Bregma -7,6 mm) segundo Paxinos e Watson (1998). A PAG foi dividida em 3 colunas, dorsomedial (dm), dorsolateral (dl) e lateral (l). Aq representa o aqueduto.



**Figura 18:** Efeito do estresse agudo e crônico na expressão de Fos nas três colunas da PAG em seis níveis (A) -5,6 mm caudal ao Bregma até (F) -7,6 mm caudal ao Bregma. (\*) diferença entre E1 e C (ANOVA  $F_{(3,10)} \leq 10,33$ ,  $p \leq 0,002$ ). (#) diferença entre E2 e C e E1+2 e C (ANOVA  $F_{(3,10)} \leq 9,02$ ,  $p \leq 0,003$ ). Controle não estressado (C), estresse agudo (E1), estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2), Coluna dorsomedial (dm), coluna dorsolateral (dl), coluna lateral (l).

### 3. Experimento 3: Efeito da microinjeção de antagonistas opióides na PAGI no comportamento maternal em ratas lactantes normais ou submetidas a estresse agudo e crônico.

Neste experimento foram considerados para análise apenas os animais onde a microinjeção atingiu a PAGI (Fig. 19).



**Figura 19:** Fotomicrografia de um corte corado pelo método de Nissl mostrando o sítio de microinjeção na PAGI. Barra de escala 300  $\mu$ m.

#### 3.1 Progresso de Recolhimento

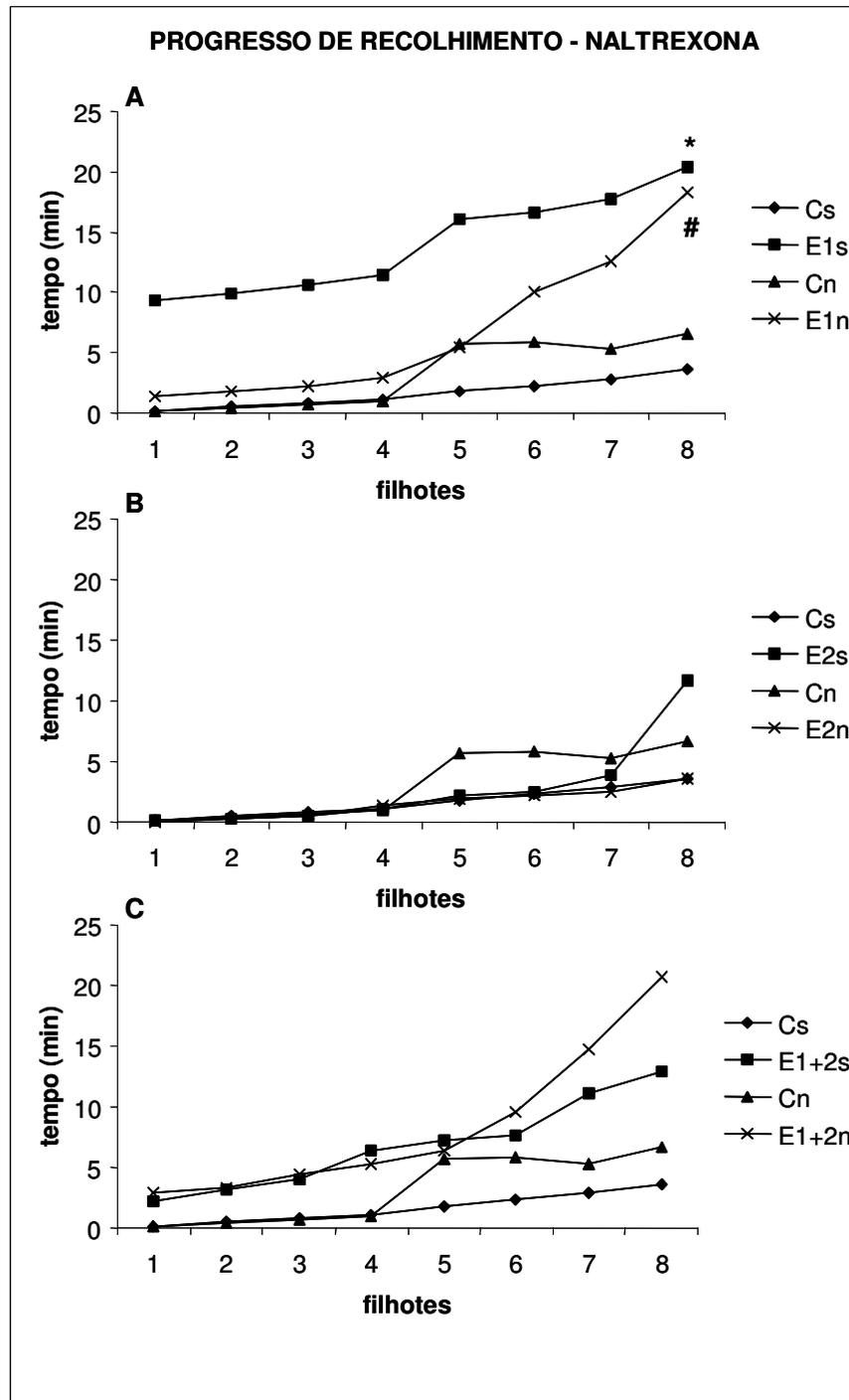
O grupo controle (Cs) demorou em média  $3,6 \pm 0,6$  min para recolher o último filhote ao ninho antes de iniciar a amamentação. Este comportamento foi alterado pelo estresse agudo. Neste experimento, as ratas submetidas às condições de estresse 1 e que receberam salina na PAGI demoraram mais para recolher os filhotes ao ninho ( $F_{(3,28)}=3,48$ ,  $p=0,02$ , *post hoc* de Duncan:  $p=0,01$ )

(Fig. 20, 21 e 22). Este grupo demorou em média  $20,3 \pm 7,4$  min para recolher o último filhote. As ratas tratadas com salina e que foram submetidas as condições de estresse crônico e estresse agudo+crônico não apresentaram diferenças significativas no progresso de recolhimento em relação às ratas controle. Estes resultados estão em conformidade com o experimento 1.

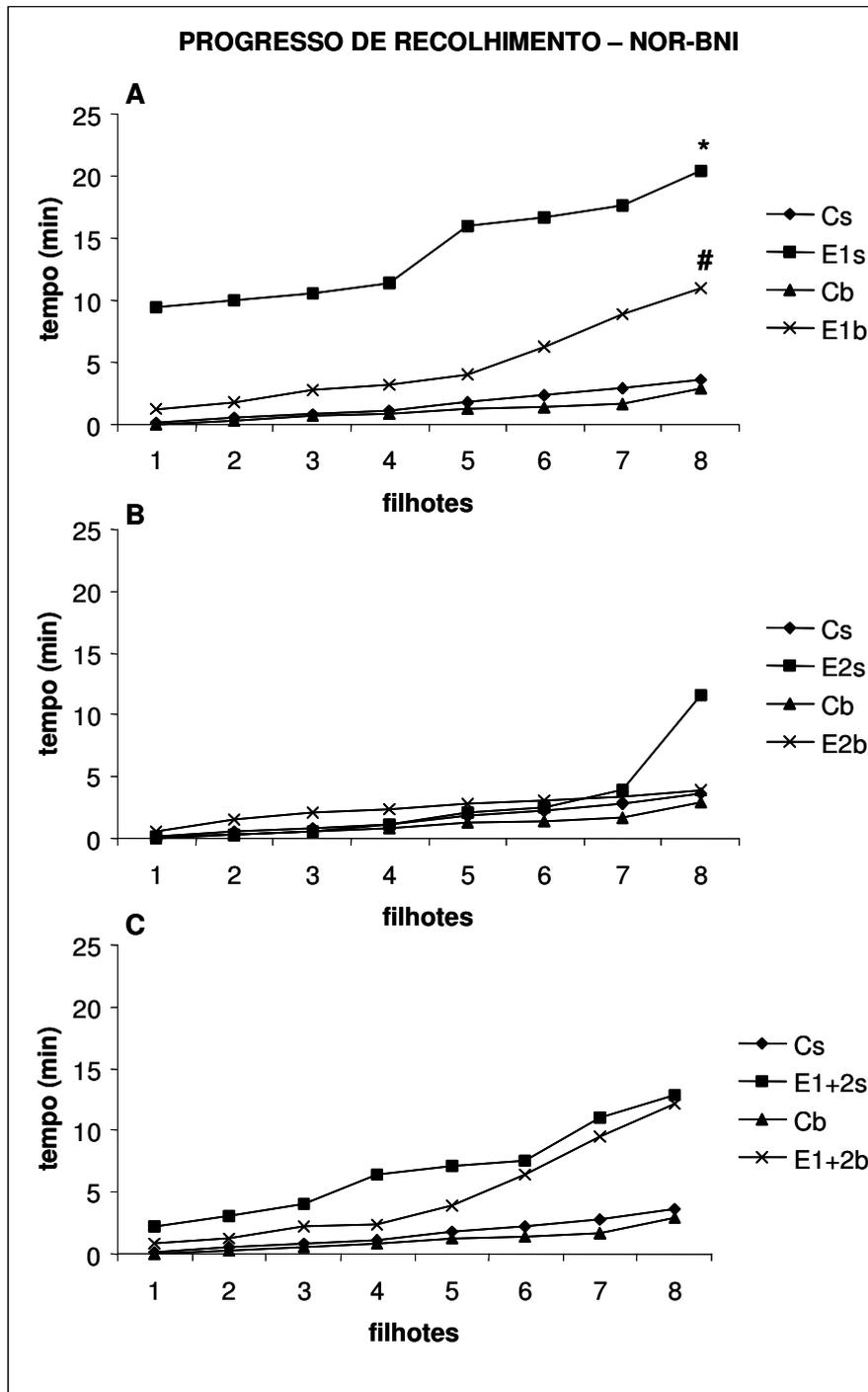
O progresso de recolhimento dos filhotes das ratas não submetidas a estresse não foi diferente entre as que receberam salina (grupo controle) e as ratas que receberam antagonistas opióides na PAGI.

Nas ratas submetidas a estresse agudo, houve diferenças significativas no progresso de recolhimento dos filhotes nos grupos que receberam antagonistas opióides na PAGI em relação às ratas tratadas com salina ( $F_{(15,108)}=2,59$ ,  $p=0,002$ ). As ratas que receberam naltrexona (Fig. 20), nor-BNI (Fig. 21) e naloxonazina (Fig. 22) na PAGI, quando submetidas às condições de estresse agudo, tiveram o progresso de recolhimento dos filhotes semelhante ao das ratas não estressadas, indicando que estes antagonistas reverteram o efeito do estresse agudo no progresso de recolhimento dos filhotes.

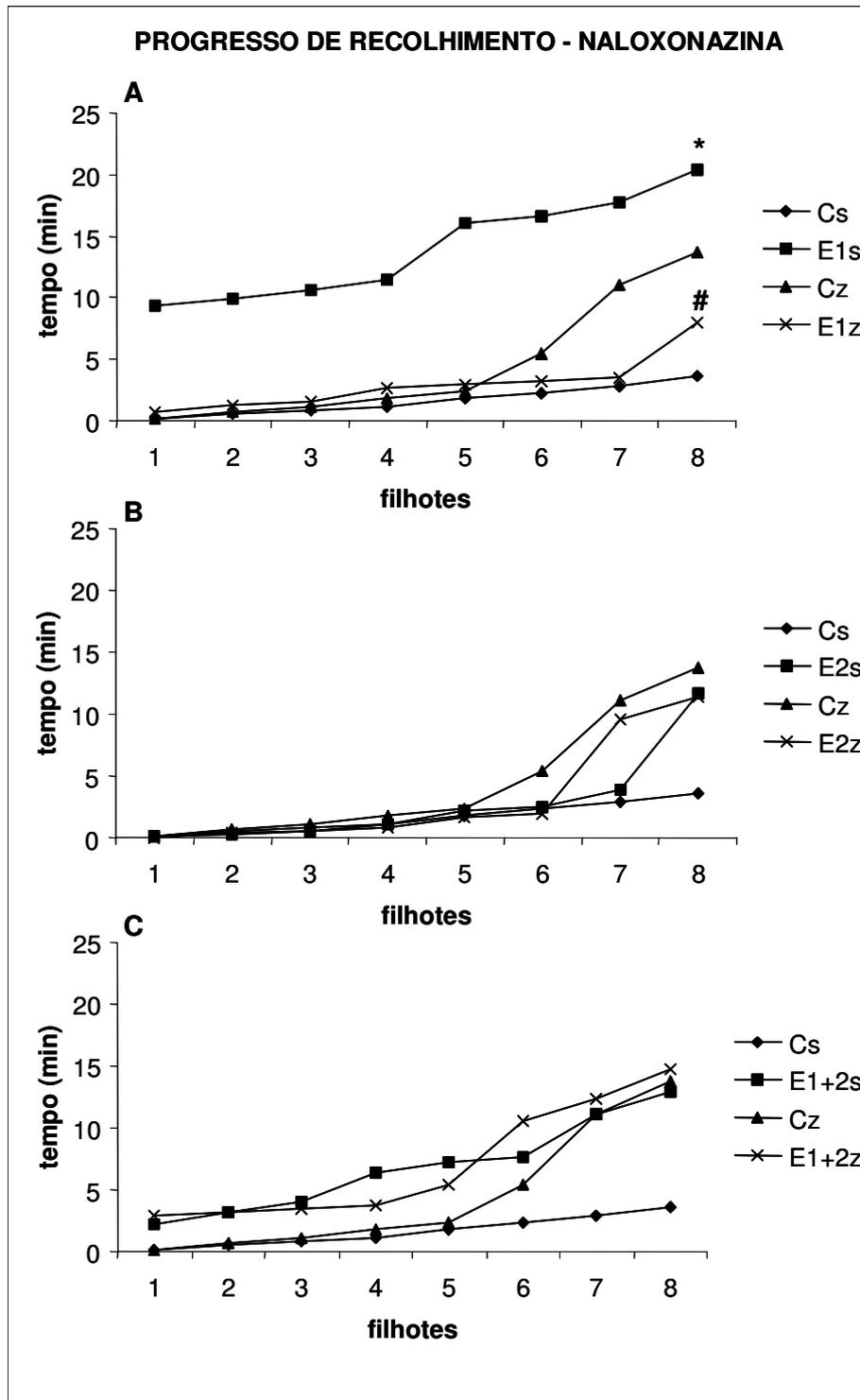
O uso de antagonistas opióides nas ratas submetidas a estresse crônico, isolado ou prévio ao estresse agudo, não foi diferente das ratas tratadas com salina submetidas ao mesmo protocolo de estresse.



**Figura 20:** Efeito do antagonista opióide naltrexona no estresse agudo (A), crônico (B) e agudo+crônico (C) no progresso de recolhimento de cada filhote ao ninho (média). (\*) diferença entre Cs e E1s (ANOVA com repetição:  $F_{(15,108)}=2,59$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,01$ ), (#) diferença entre E1s e E1n (*post hoc* de Duncan,  $p=0,02$ ). Controle não estressado: salina (Cs), naltrexona (Cn); estresse agudo: salina (E1s), naltrexona (E1n); estresse crônico: salina (E2s), naltrexona (E2s); estresse agudo+crônico: salina (E1+2s), naltrexona (E1+2n).



**Figura 21:** Efeito do antagonista opióide nor-BNI no estresse agudo (A), crônico (B) e agudo+crônico (C) no progresso de recolhimento de cada filhote ao ninho (média). (\*) diferença entre Cs e E1s (ANOVA com repetição:  $F_{(15,108)}=2,59$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,01$ ), (#) diferença entre E1s e E1b (*post hoc* de Duncan,  $p=0,005$ ). Controle não estressado: salina (Cs), nor-BNI (Cb); estresse agudo: salina (E1s), nor-BNI (E1b); estresse crônico: salina (E2s), nor-BNI (E2b); estresse agudo+crônico: salina (E1+2s), nor-BNI (E1+2b).



**Figura 22:** Efeito do antagonista opióide naloxonazina no estresse agudo (A), crônico (B) e agudo+crônico (C) no progresso de recolhimento de cada filhote ao ninho (média). (\*) diferença entre Cs e E1s (ANOVA com repetição:  $F_{(15,108)}=2,59$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,01$ ), (#) diferença entre E1s e E1z (*post hoc* de Duncan,  $p=0,001$ ). Controle não estressado: salina (Cs), naloxonazina (Cz); estresse agudo: salina (E1s), naloxonazina (E1z); estresse crônico: salina (E2s), naloxonazina (E2z); estresse agudo+crônico: salina (E1+2s), naloxonazina (E1+2z).

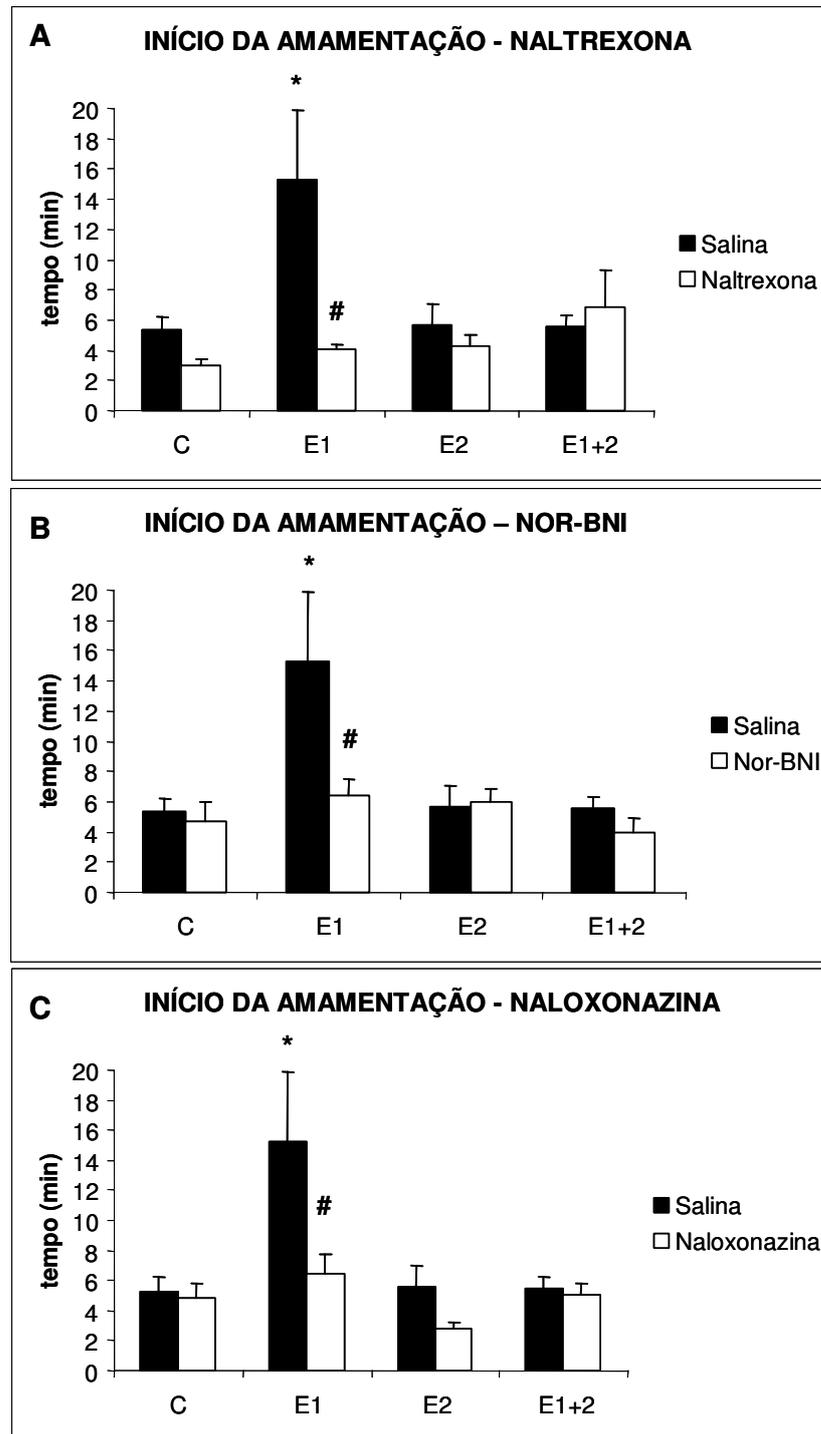
### 3.2 Início da Amamentação

Ratas controle que receberam salina (grupo Cs) iniciaram a amamentação em  $5,3 \pm 0,9$  min. Conforme o experimento 1, as ratas submetidas às condições de estresse agudo (grupo E1s) demoraram mais ( $15,2 \pm 4,5$  min) para iniciar a amamentação comparadas ao grupo controle ( $F_{(3,28)}=4,58$ ,  $p=0,009$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,007$ ) (Fig. 23). Os grupos E2s e E1+2s não apresentaram diferenças significativas na latência para o início da amamentação comparadas ao grupo controle.

Nas ratas não estressadas que receberam antagonistas opióides na PAGI, a latência para o início da amamentação não foi estatisticamente diferente em relação ao grupo salina.

Entretanto, houve diferenças significativas no início da amamentação em ratas submetidas às condições de estresse agudo tratadas com antagonistas opióides em relação ao grupo que recebeu salina ( $F_{(15,108)}=3,64$ ,  $p=0,00004$ ). As ratas submetidas a estresse agudo demoraram mais para iniciar a amamentação dos filhotes em relação às ratas controle. Esse efeito foi revertido pelo uso de antagonistas opióides na PAGI (Fig. 23).

Em ratas submetidas às condições de estresse crônico, a latência para o início da amamentação não foi diferente entre as ratas tratadas com antagonistas opióides e as ratas tratadas com salina.



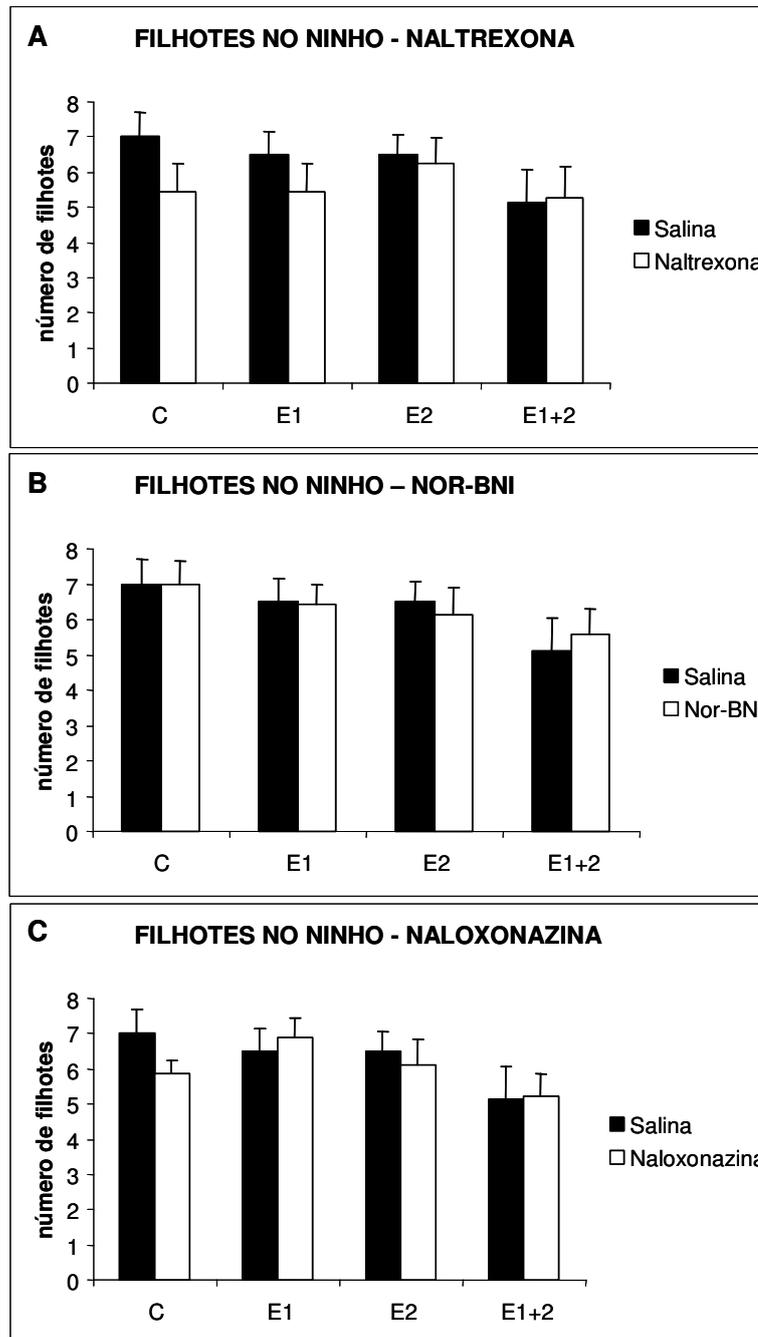
**Figura 23:** Efeito dos antagonistas opióides (A) Naltrexona, (B) Nor-BNI e (C) Naloxonazina no estresse agudo e crônico na latência para o início da amamentação (média + e.p.m). (\*) diferença entre Cs e E1s (*post hoc* de Duncan,  $p=0,007$ ); (#) diferença entre (A) E1s e E1n (*post hoc* de Duncan,  $p=0,00001$ ), (B) E1s e E1b (*post hoc* de Duncan,  $p=0,0001$ ), (C) E1s e E1z (*post hoc* de Duncan,  $p=0,0001$ ). Controle não estressado (C), estresse agudo (E1), estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2).

### 3.3 Filhotes no Ninho

As ratas não submetidas às condições de estresse, que receberam salina, tinham em média  $7,0 \pm 0,7$  filhotes no ninho no início da amamentação. Para as ratas que receberam salina na PAGI, não foram encontradas diferenças significativas no número de filhotes no ninho nos grupos submetidos a estresse agudo e crônico ( $F_{(3,28)}=1,41$ ,  $p=0,25$ ) (Fig. 24).

O uso de antagonistas opióides na PAGI não modificou estatisticamente o número de filhotes no ninho ( $F_{(15,108)}=0,95$ ,  $p=0,50$ ).

Em ratas sob as condições de estresse agudo e estresse crônico, não foram encontradas diferenças significativas no número de filhotes presente no ninho no início da amamentação entre os grupos tratados com antagonistas opióides e as ratas que receberam salina (Fig. 24).



**Figura 24:** Efeito dos antagonistas opióides (A) Naltrexona, (B) Nor-BNI e (C) Naloxonazina no estresse agudo e crônico no número de filhotes presente no ninho no início da amamentação (média + e.p.m.) (ANOVA:  $F_{(15,108)}=0,95$ ,  $p=0,50$ ). Controle não estressado (C), estresse agudo (E1), estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2).

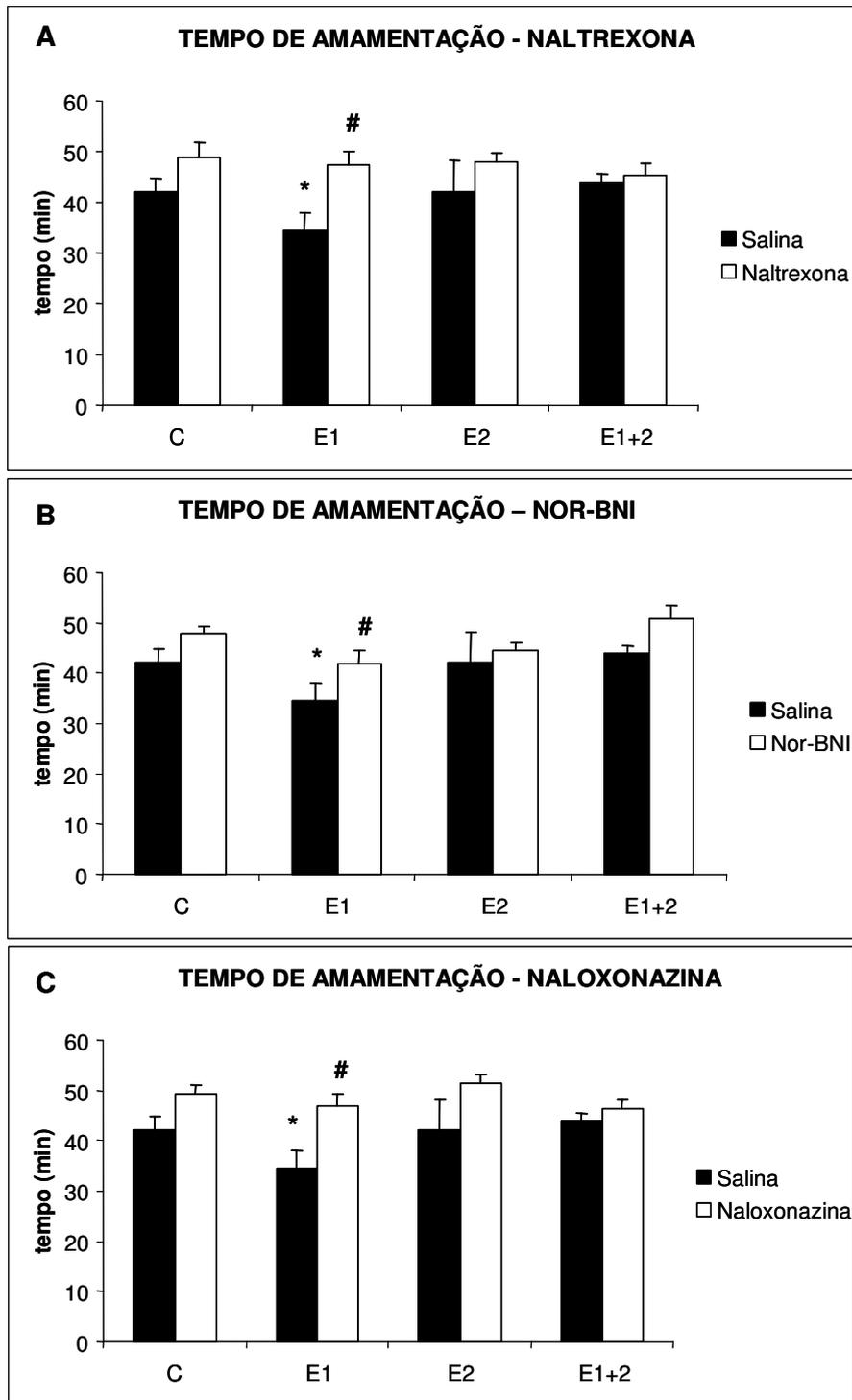
### 3.4 Tempo de Amamentação

O tempo total em que as ratas controle não estressadas que receberam salina permaneceram em postura de amamentação ao longo do experimento foi de  $42,0 \pm 2,7$  min. As ratas que foram submetidas a estresse agudo (grupo E1s) permaneceram menos tempo ( $34,4 \pm 3,4$  min, *post hoc* de Duncan,  $p=0,05$ ) amamentando os seus filhotes comparadas às ratas do grupo Cs, conforme o experimento 1 (Fig. 25). Os grupo E2s e E1+2s não apresentaram diferenças significativas no tempo total de amamentação em relação ao grupo controle.

Em ratas não estressadas, o tempo em que as mães permaneceram amamentando os filhotes não foi diferente entre as ratas tratadas com antagonistas opióides na PAGI e as ratas que receberam salina.

O uso de antagonistas opióides na PAGI em ratas submetidas a estresse agudo aumentou o tempo total em que as ratas permaneceram em postura de amamentação, comparadas às ratas controle ( $F_{(15,108)}=2,82$ ,  $p=0,0009$ ) (Fig. 25). Estes antagonistas revertaram o efeito do estresse agudo no tempo em que as ratas permanecem em postura de amamentação ao longo do experimento.

Em ratas submetidas às condições de estresse crônico não foram encontradas diferenças significativas entre as ratas tratadas com salina e as ratas que receberam antagonistas opióides na PAGI.



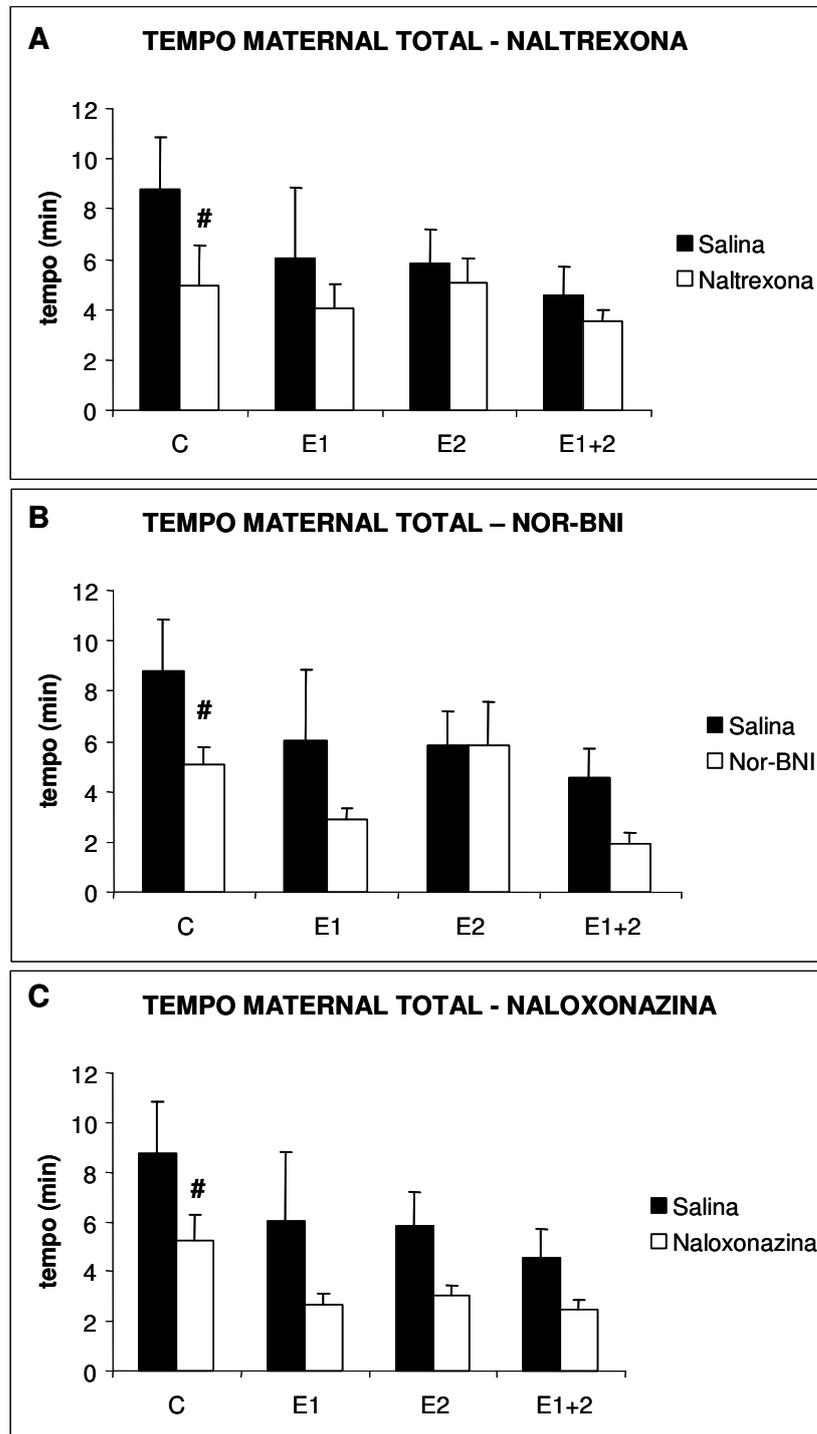
**Figura 25:** Efeito dos antagonistas opióides (A) Naltrexona, (B) Nor-BNI e (C) Naloxonazina no estresse agudo e crônico no tempo total em que a rata permanece em postura de amamentação (média + e.p.m). (\*) diferença entre Cs e E1s (*post hoc* de Duncan,  $p=0,05$ ); (#) diferença entre (A) E1s e E1n (*post hoc* de Duncan,  $p=0,001$ ), (B) E1s e E1b (*post hoc* de Duncan,  $p=0,03$ ) e (C) E1s e E1z (*post hoc* de Duncan,  $p=0,002$ ). Controle não estressado (C), estresse agudo (E1), estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2).

### 3.5 Tempo Maternal

O tempo em que as ratas do grupo controle, que receberam salina, permaneceram em comportamento maternal foi de  $8,7 \pm 2,0$  min. Não houve diferenças significativas neste tempo nas ratas submetidas a estresse agudo ou crônico ( $F_{(3,28)}=0,94$ ,  $p=0,43$ ) (Fig. 26).

Em ratas não estressadas, os antagonistas opióides diminuíram o tempo maternal em relação às ratas que receberam salina ( $F_{(15,108)}=2,21$ ,  $p=0,009$ , *post hoc* de Duncan,  $p \leq 0,05$ ) (Fig. 26).

Em ratas submetidas às condições de estresse agudo e estresse crônico não foram encontradas diferenças significativas no tempo maternal entre ratas tratadas com antagonistas opióides e as ratas que receberam salina.



**Figura 26:** Efeito dos antagonistas opióides (A) Naltrexona, (B) Nor-BNI e (C) Naloxonazina no estresse agudo e crônico no tempo em que a rata permanece em atividade maternal ao longo do experimento (média + e.p.m). (#) diferença entre (A) Cs e Cn (*post hoc* de Duncan,  $p=0,04$ ), (B) Cs e Cb (*post hoc* de Duncan,  $p=0,05$ ) e (C) Cs e Cz (*post hoc* de Duncan,  $p=0,05$ ). Controle não estressado (C), estresse agudo (E1), estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2).

### 3.6 Tempo Não Maternal

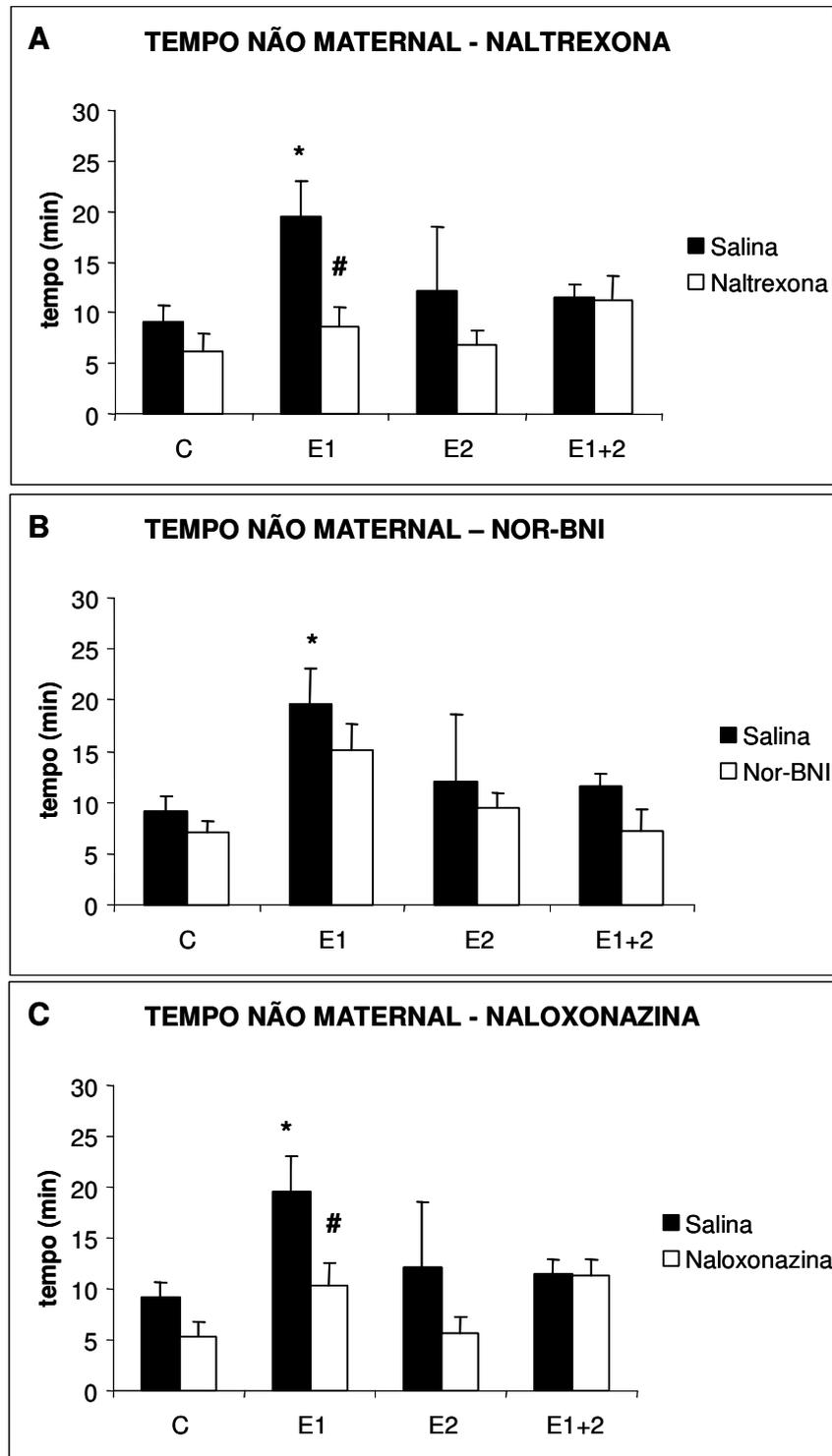
Ratas do grupo controle, não submetidas às condições de estresse, que receberam salina, permaneceram  $9,1 \pm 1,4$  min em atividades não maternais ao longo do experimento. As ratas submetidas a estresse agudo passaram mais tempo em atividades não maternais, conforme o experimento 1 (*post hoc* de Duncan,  $p=0,007$ ) (Fig. 27). O estresse crônico e estresse agudo+crônico não alterou o tempo não maternal nas ratas que receberam salina ( $F_{(3,28)}=1,57$ ,  $p=0,21$ ).

O tempo não maternal também não foi estatisticamente diferente entre as ratas não estressadas que receberam antagonistas opióides na PAGI.

Nas ratas submetidas às condições de estresse agudo, os antagonistas naltrexona e naloxonazina diminuíram o tempo de atividades não maternais em relação às ratas que receberam salina ( $F_{(15,108)}=2,54$ ,  $p=0,002$ , *post hoc* de Duncan,  $p\leq 0,01$ ) (Fig. 27).

As ratas que receberam nor-BNI nas condições de estresse agudo permaneceram mais tempo em atividades não maternais em relação ao grupo Cb (*post hoc* de Duncan,  $p=0,04$ ) (Fig. 27). Ao contrário dos outros antagonistas, nor-BNI não reverteu o efeito do estresse agudo no tempo não maternal.

Não foram encontradas diferenças estatísticas no tempo não maternal entre as ratas submetidas a estresse crônico e estresse agudo+crônico entre os diferentes tratamentos.



**Figura 33:** Efeito dos antagonistas opióides (A) Naltrexona, (B) Nor-BNI e (C) Naloxonazina no estresse agudo e crônico no tempo em que a rata permanece em comportamento não maternal (média + e.p.m). (\*) diferença entre Cs e E1s (*post hoc* de Duncan,  $p=0,007$ ); (#) diferença entre (A) E1s e E1n (*post hoc* de Duncan,  $p=0,004$ ) e (C) E1s e E1z (*post hoc* de Duncan,  $p=0,01$ ). Controle não estressado (C), estresse agudo (E1), estresse crônico (E2) e estresse agudo+crônico (E1+2).

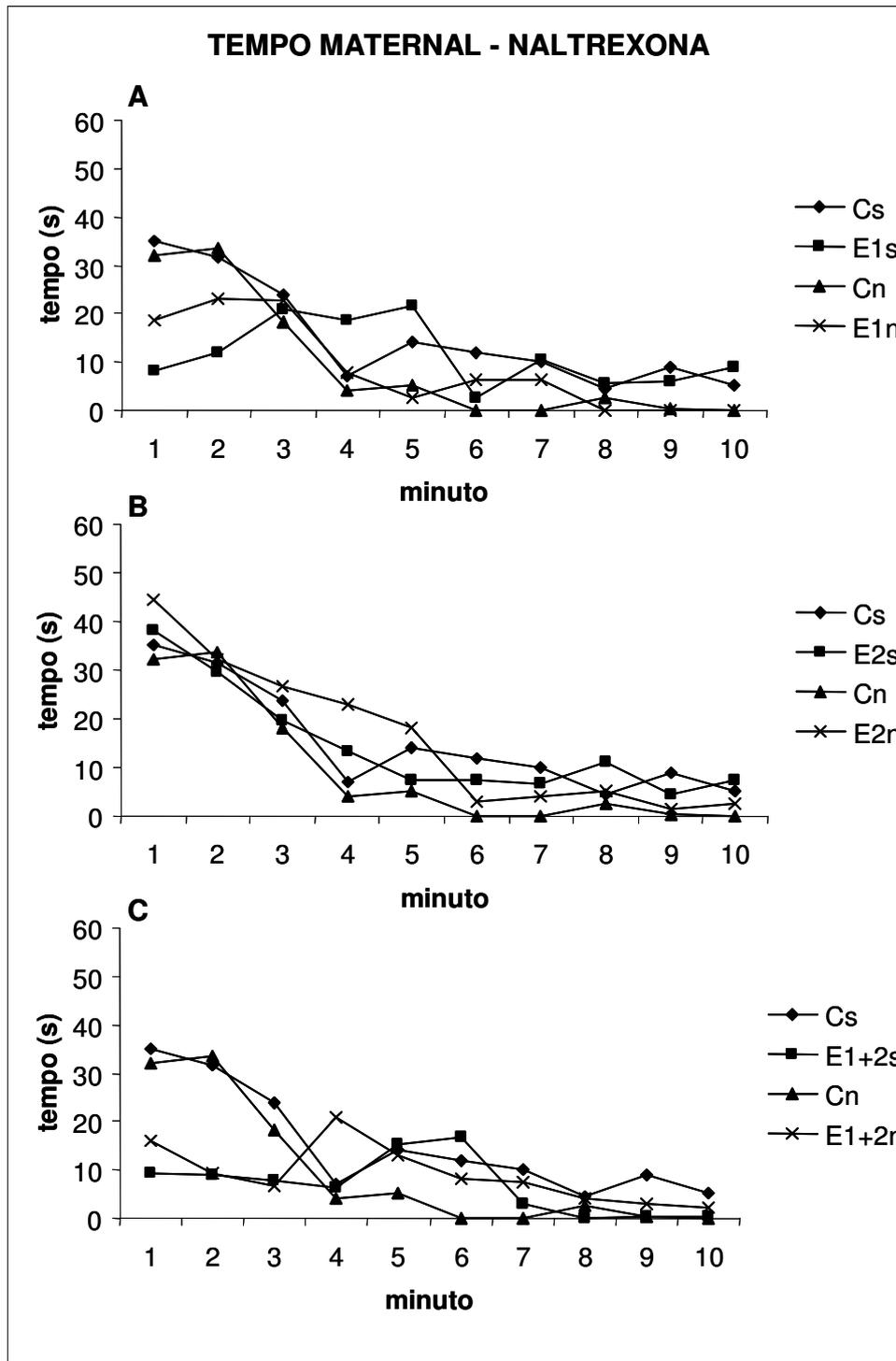
### **3.7 Análise minuto-a-minuto**

#### **3.7.1 Tempo Maternal**

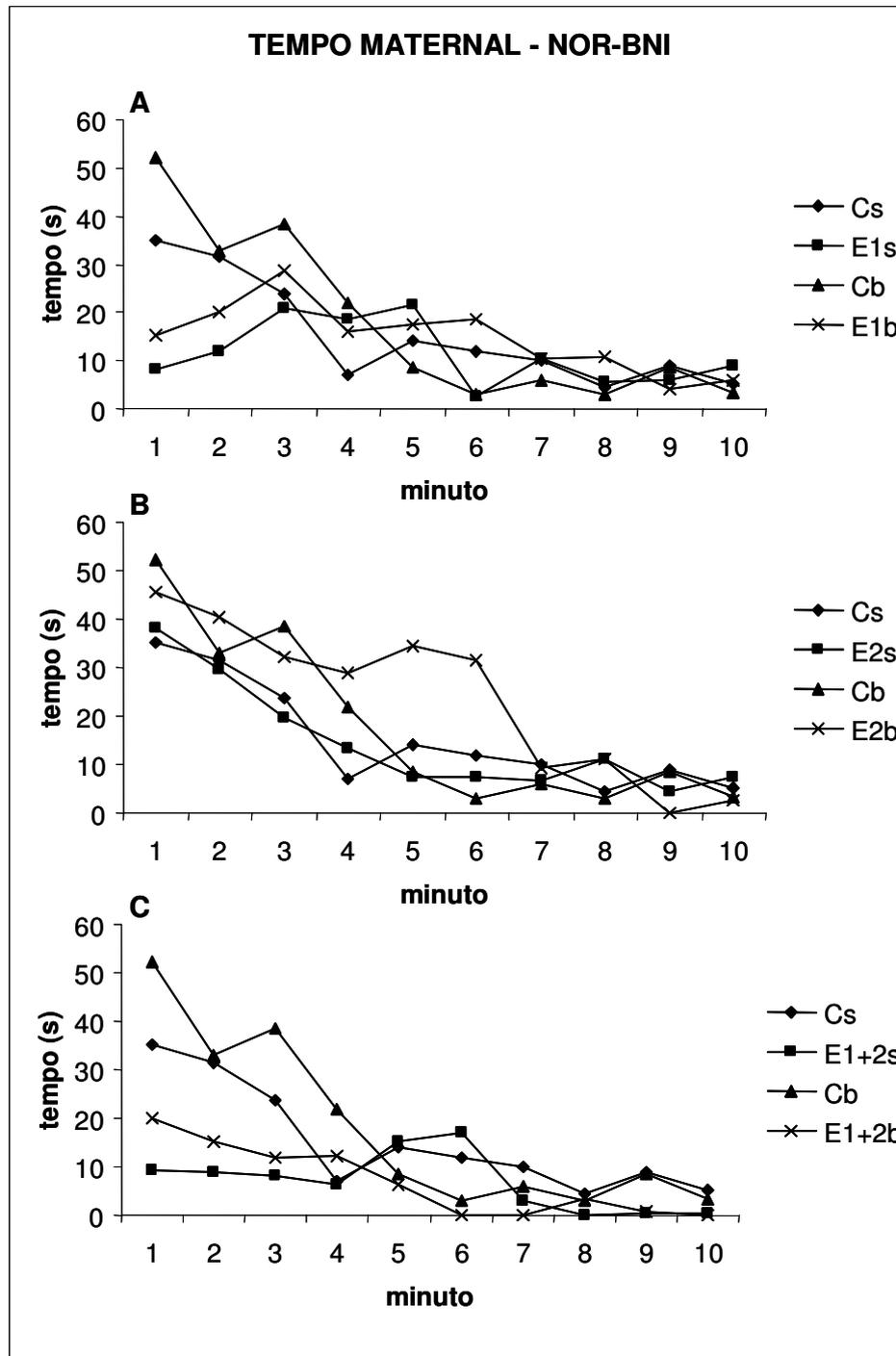
A análise minuto-a-minuto do tempo maternal das ratas controle que receberam salina não foi diferente entre o grupos não estressado e submetidos a estresse agudo ou crônico ( $F_{(9,252)}=11,74$ ,  $p=0,1$ ) (Fig. 28, 29 e 30).

Este tempo também não foi diferente entre as ratas do grupo controle e as ratas que receberam microinjeção de antagonistas opióides na PAGI (ANOVA com repetição,  $p>0,05$ ). O tempo maternal diminuiu ao longo do tempo para todos os grupos.

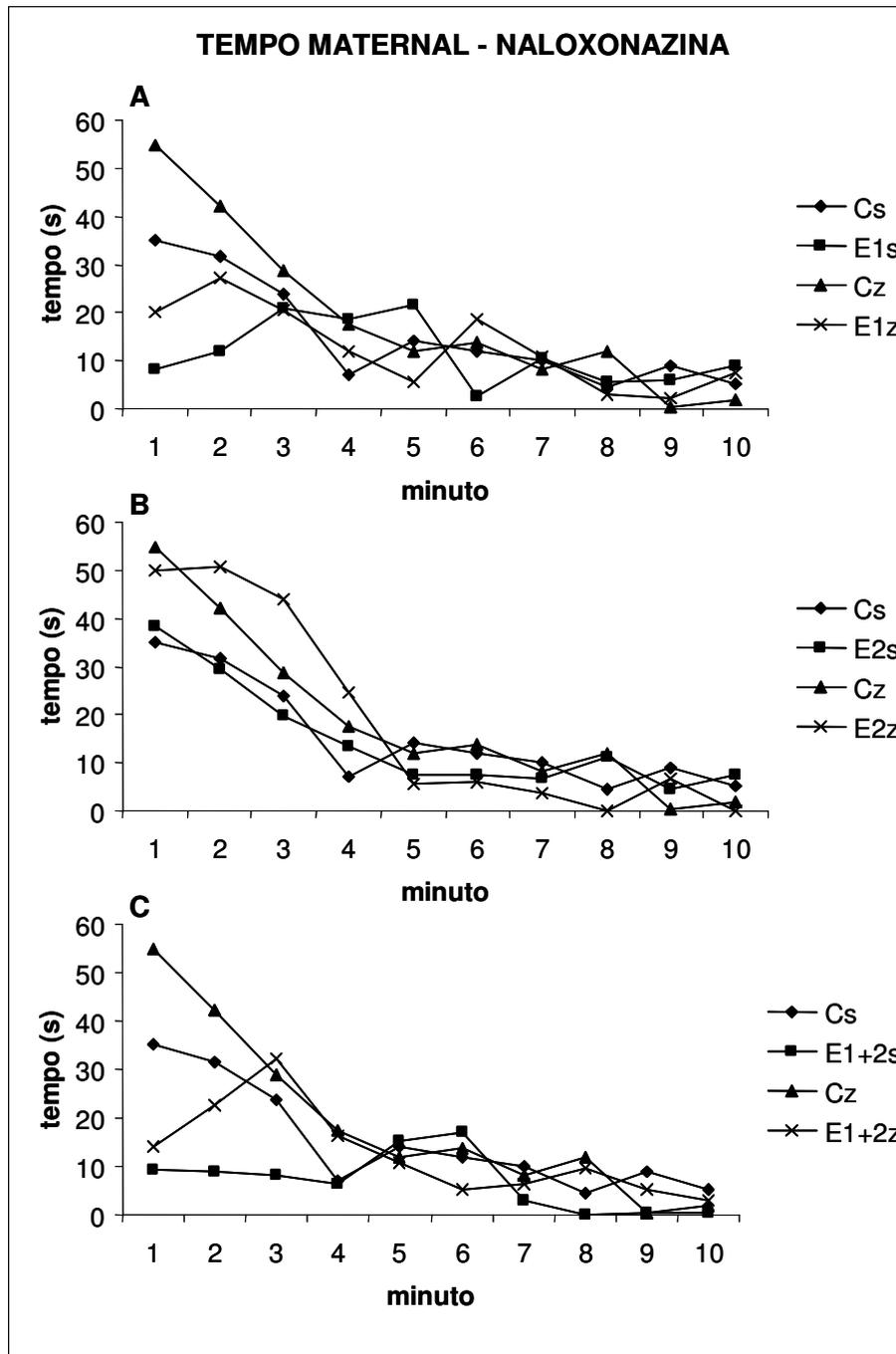
O tempo maternal durante os primeiros minutos não foi estatisticamente modificado pelos antagonistas opióides nas condições de estresse agudo e crônico.



**Figura 28:** Efeito do antagonista opióide naltrexona no estresse agudo (A), crônico (B) e agudo+crônico (C) no tempo maternal durante os 10 primeiros minutos (média). Controle não estressado: salina (Cs), naltrexona (Cn); estresse agudo: salina (E1s), naltrexona (E1n); estresse crônico: salina (E2s), naltrexona (E2s); estresse agudo+crônico: salina (E1+2s), naltrexona (E1+2n).



**Figura 29:** Efeito do antagonista opióide nor-BNI no estresse agudo (A), crônico (B) e agudo+crônico (C) no tempo maternal durante os 10 primeiros minutos (média). Controle não estressado: salina (Cs), nor-BNI (Cb); estresse agudo: salina (E1s), nor-BNI (E1b); estresse crônico: salina (E2s), nor-BNI (E2b); estresse agudo+crônico: salina (E1+2s), nor-BNI (E1+2b).



**Figura 30:** Efeito do antagonista opióide naloxonazina no estresse agudo (A), crônico (B) e agudo+crônico (C) no tempo maternal durante os 10 primeiros minutos (média). Controle não estressado: salina (Cs), naloxonazina (Cz); estresse agudo: salina (E1s), naloxonazina (E1z); estresse crônico: salina (E2s), naloxonazina (E2z); estresse agudo+crônico: salina (E1+2s), naloxonazina (E1+2z).

### 3.7.2 Tempo Não Maternal

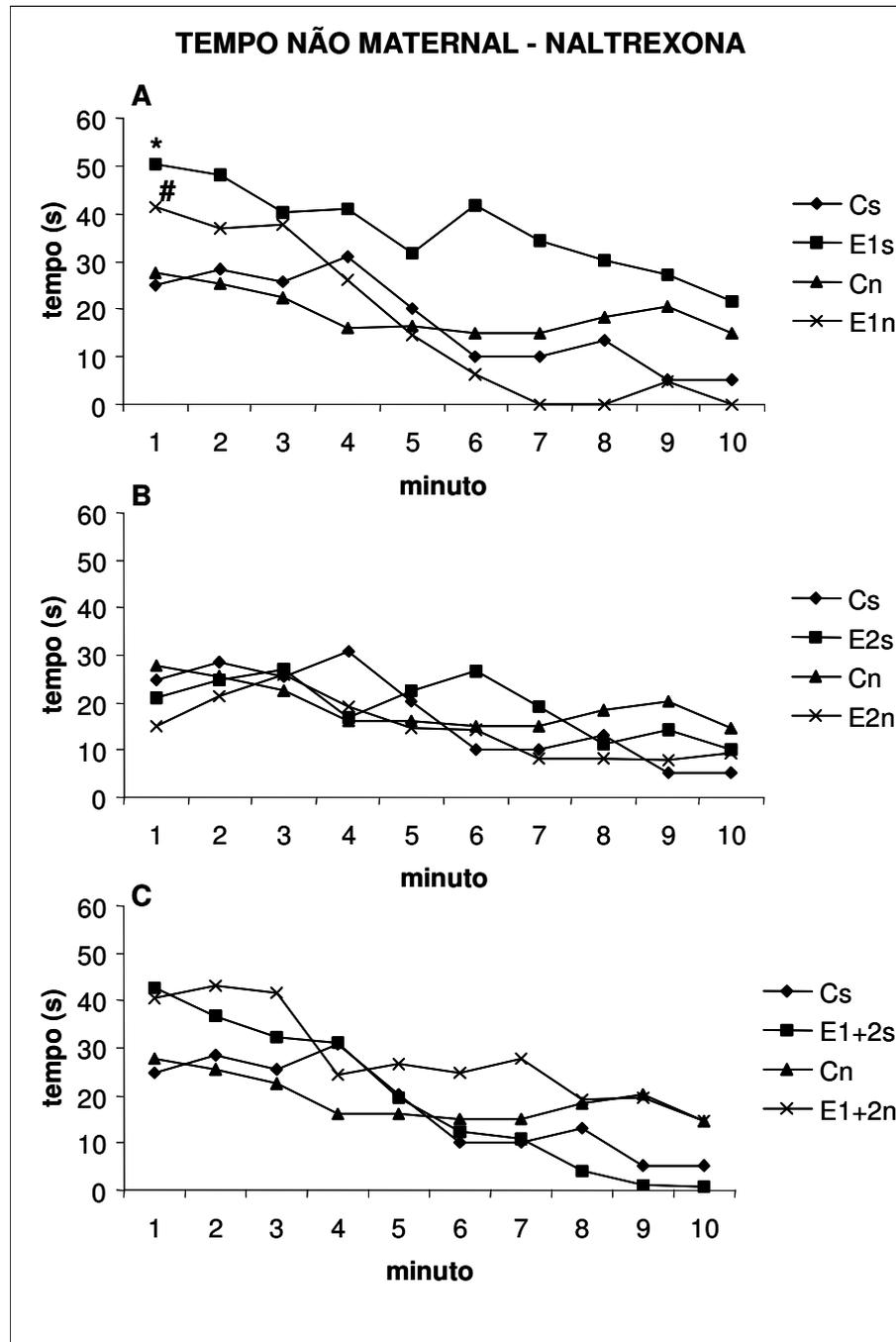
O tempo em que as ratas permaneceram em atividades não maternais no grupo controle não estressado que recebeu salina foi de  $24,8 \pm 8,5$  s no primeiro minuto. Houve diferenças significativas neste tempo nas ratas submetidas a estresse agudo em relação às ratas controle, conforme o experimento 1 (ANOVA com repetição  $F_{(3,28)}=4,45$ ,  $p=0,01$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,006$ ) (Fig. 31, 32 e 33).

As ratas que foram submetidas a estresse crônico e estresse agudo+crônico não apresentaram diferenças significativas no tempo não maternal em relação ao grupo controle.

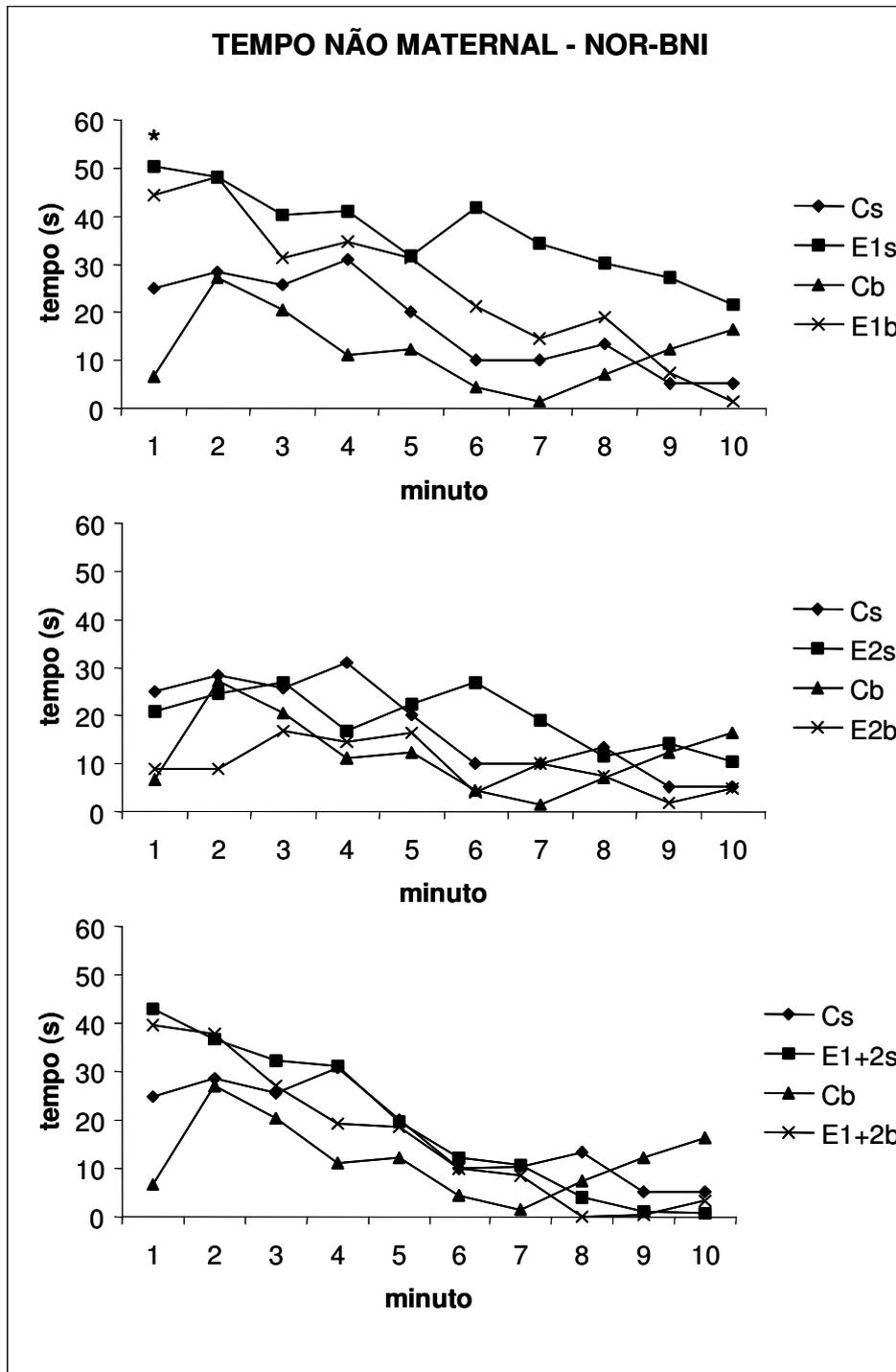
Em ratas tratadas com antagonistas opióides na PAGI não submetidas as condições de estresse, o tempo gasto em atividade não maternais durante os primeiros minutos do experimento foi estatisticamente semelhante às ratas que receberam salina.

Houve diferenças significativas no tempo não maternal em ratas submetidas a estresse agudo. Em ratas que receberam salina, o estresse agudo aumentou o tempo de atividades não maternais durante os primeiros minutos do experimento, como já foi observado. Ratas que receberam naltrexona nessas condições de estresse apresentaram menos tempo em comportamento não maternal comparadas as ratas que receberam salina ( $F_{(15,109)}=2,36$ ,  $p=0,005$ ) (Fig. 31). Ratas nas condições de estresse agudo que receberam nor-BNI e naloxonazina não apresentaram diferenças significativas no tempo não maternal comparadas às ratas que receberam salina (Fig. 32 e 33).

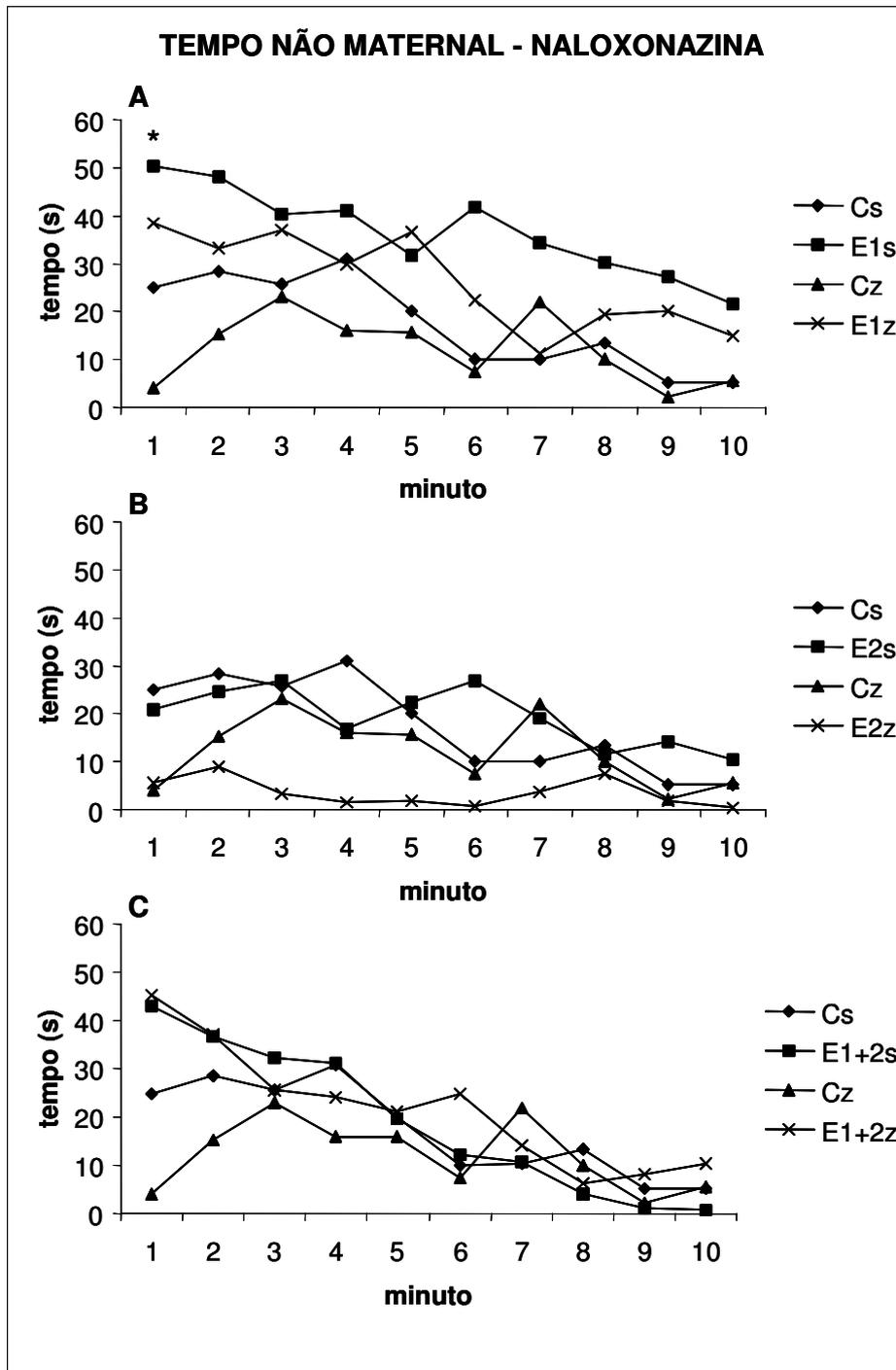
Os antagonistas opióides não modificaram o tempo não materno em ratas sob as condições de estresse crônico e estresse agudo+crônico.



**Figura 31:** Efeito do antagonista opióide naltrexona no estresse agudo (A), crônico (B) e agudo+crônico (C) no tempo não materno durante os 10 primeiros minutos (média). (\*) diferença entre Cs e E1s (*post hoc* de Duncan,  $p=0,006$ ); (#) diferença entre E1s e E1n (*post hoc* de Duncan,  $p=0,02$ ). Controle não estressado: salina (Cs), naltrexona (Cn); estresse agudo: salina (E1s), naltrexona (E1n); estresse crônico: salina (E2s), naltrexona (E2s); estresse agudo+crônico: salina (E1+2s), naltrexona (E1+2n).



**Figura 32:** Efeito do antagonista opióide nor-BNI no estresse agudo (A), crônico (B) e agudo+crônico (C) no tempo não maternal durante os 10 primeiros minutos (média). (\*) diferença entre Cs e E1s (*post hoc* de Duncan,  $p=0,006$ ). Controle não estressado: salina (Cs), nor-BNI (Cb); estresse agudo: salina (E1s), nor-BNI (E1b); estresse crônico: salina (E2s), nor-BNI (E2b); estresse agudo+crônico: salina (E1+2s), nor-BNI (E1+2b).



**Figura 33:** Efeito do antagonista opióide naloxonazina no estresse agudo (A), crônico (B) e agudo+crônico (C) no tempo não materno durante os 10 primeiros minutos (média). (\*) diferença entre Cs e E1s (*post hoc* de Duncan,  $p=0,006$ ). Controle não estressado: salina (Cs), naloxonazina (Cz); estresse agudo: salina (E1s), naloxonazina (E1z); estresse crônico: salina (E2s), naloxonazina (E2z); estresse agudo+crônico: salina (E1+2s), naloxonazina (E1+2z).

### 3.7.3 Tempo de Amamentação

O tempo em que as ratas permaneceram em postura de amamentação aumentou ao longo dos primeiros 10 minutos. As ratas do grupo controle passaram  $48,0 \pm 5,0$  s no último minuto amamentando seus filhotes. Conforme o experimento 1, as ratas submetidas a estresse agudo permaneceram menos tempo em postura de amamentação em relação às ratas não estressadas (ANOVA com repetição  $F_{(3,28)}=4,71$ ,  $p=0,008$ , *post hoc* de Duncan,  $p=0,02$ ) (Fig. 34, 35 e 36).

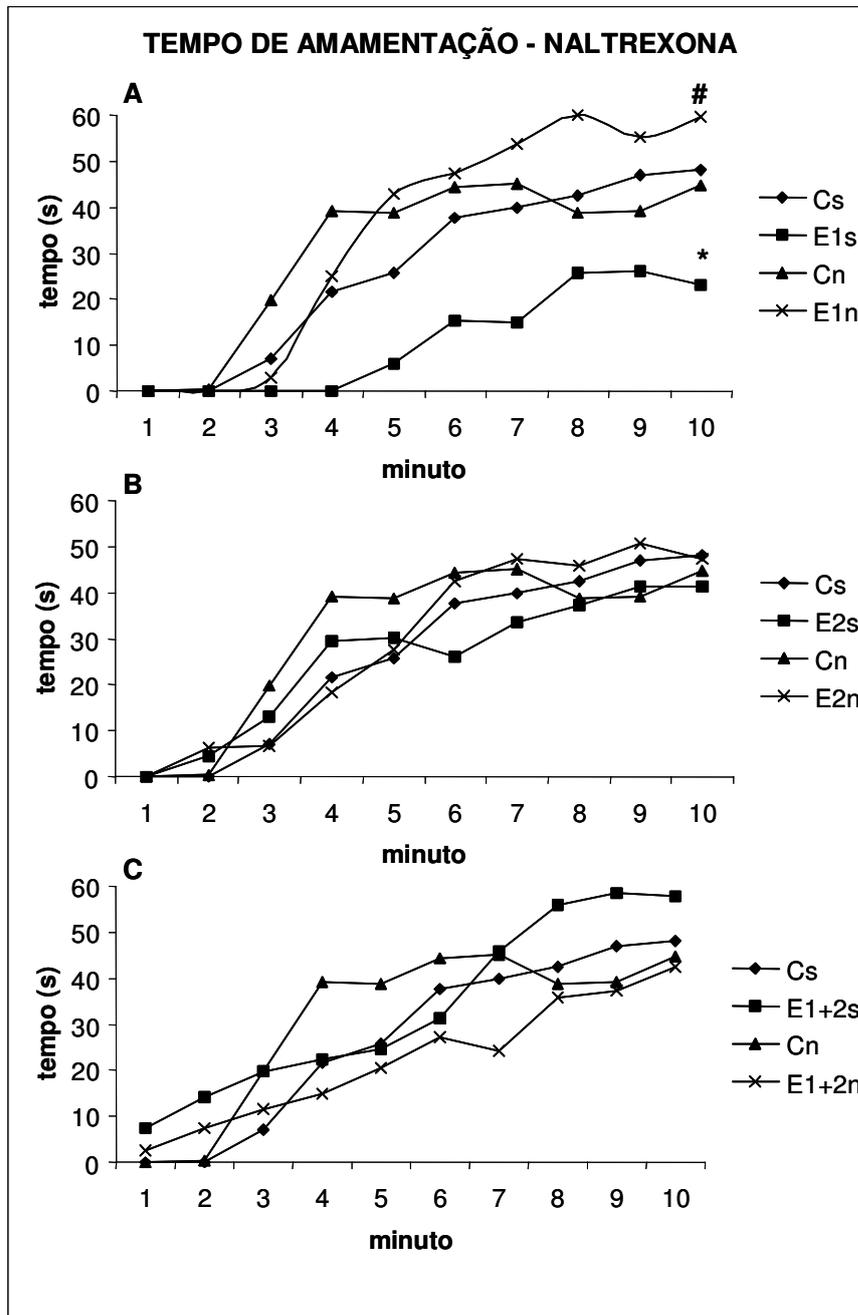
As ratas dos grupos E2s e E1+2s não apresentaram diferenças significativas no tempo de amamentação em relação às ratas não estressadas.

O tempo de amamentação durante os primeiros minutos não foi diferente entre as ratas não estressadas microinjetadas com salina ou com antagonistas opióides.

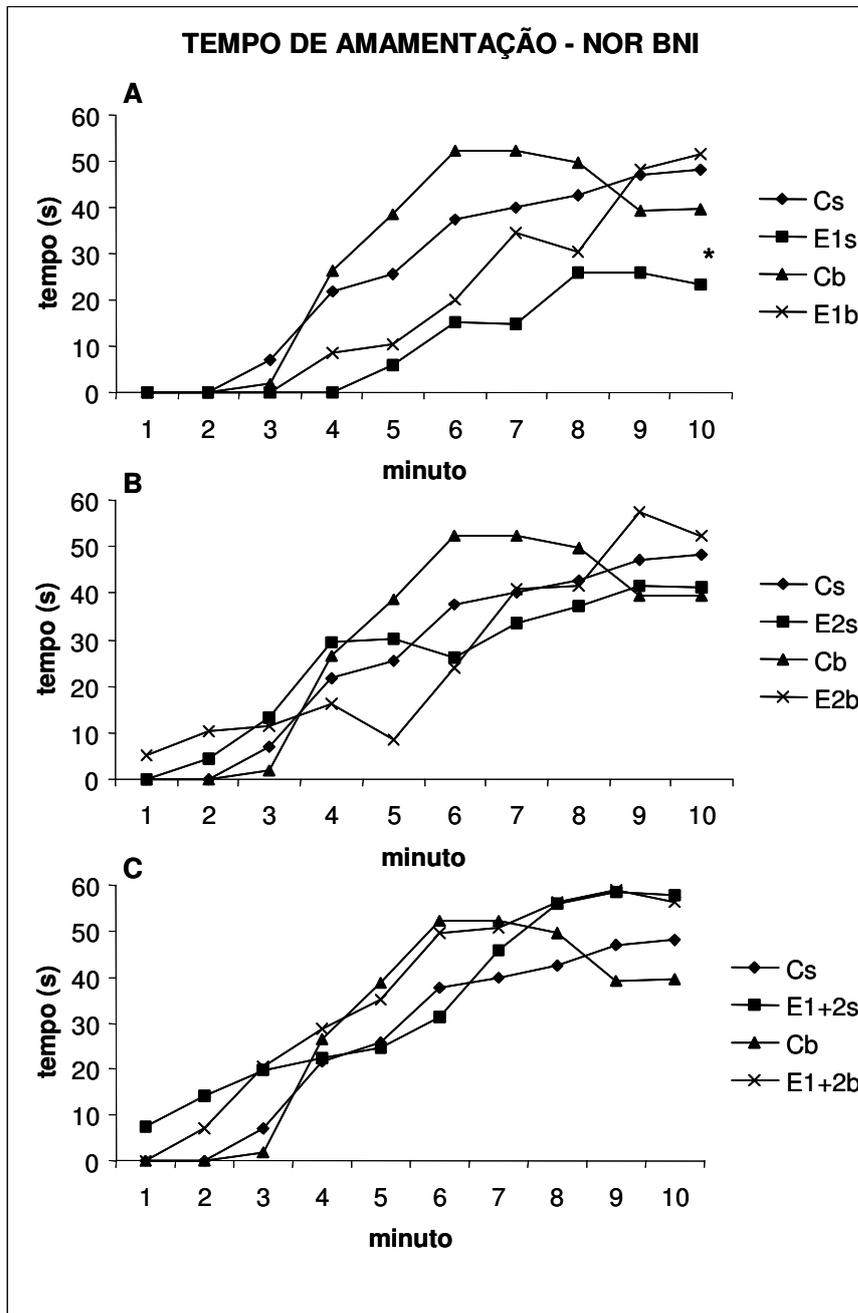
Nas ratas submetidas a estresse agudo, naltrexona reverteu o tempo em que as ratas permaneceram em postura de amamentação ( $F_{(15,109)}=2,36$ ,  $p=0,005$ ). O grupo E1n permaneceu mais tempo amamentando os filhotes nos primeiros 10 min que às ratas do grupo E1s (*post hoc* de Duncan,  $p=0,05$ ) (Fig. 34).

Não foram encontradas diferenças significativas no tempo de amamentação nos grupos submetidos a estresse agudo que receberam nor-BNI e naloxonazina em relação às ratas tratadas com salina (Fig. 35 e 36).

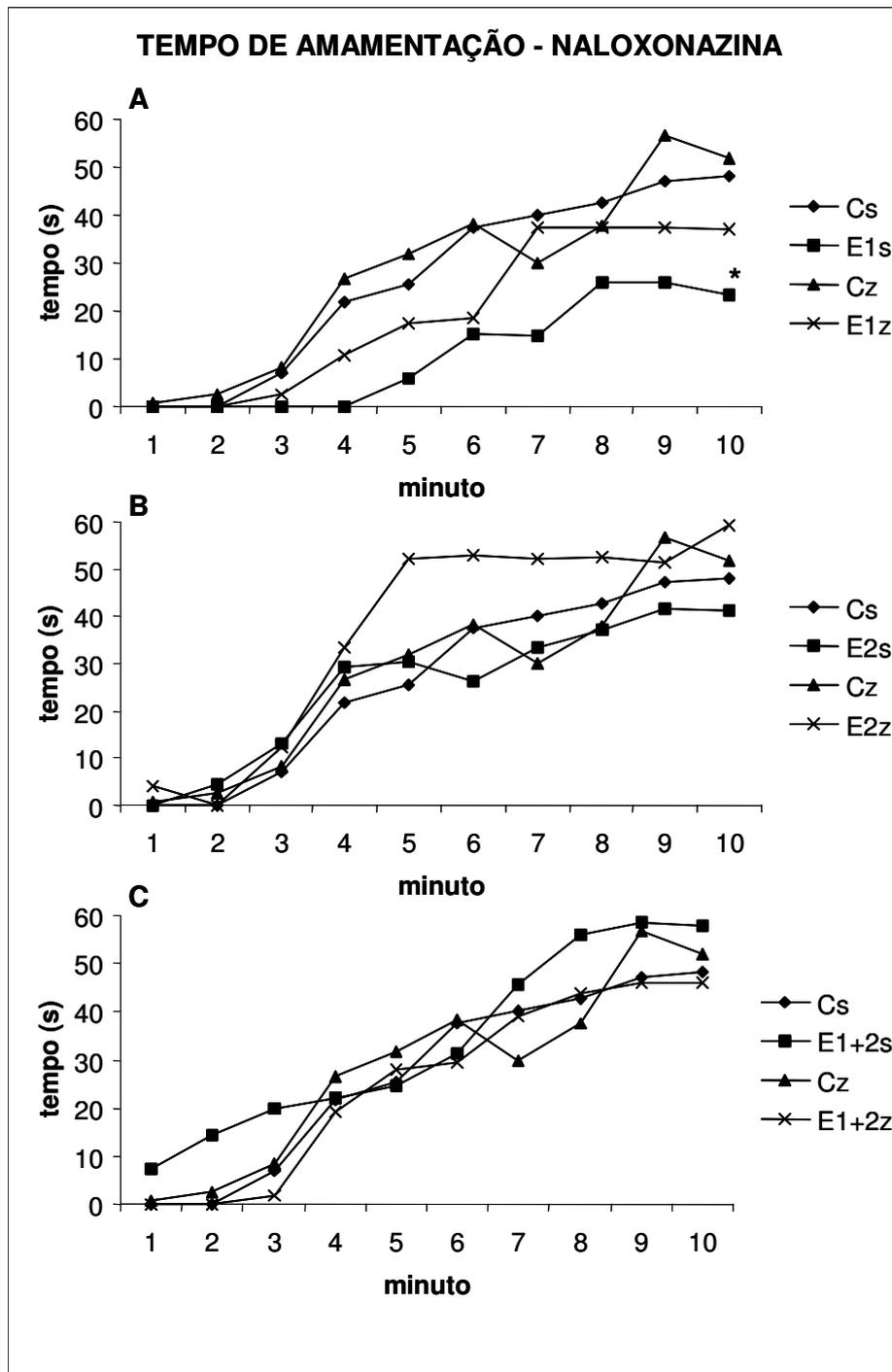
Em relação as ratas submetidas a estresse crônico e estresse agudo+crônico não houve diferenças significativas neste tempo entre os grupos.



**Figura 34:** Efeito do antagonista opióide naltrexona no estresse agudo (A), crônico (B) e agudo+crônico (C) no tempo de amamentação durante os 10 primeiros minutos (média). (\*) diferença entre Cs e E1s (*post hoc* de Duncan,  $p=0,02$ ); (#) diferença entre E1s e E1n (*post hoc* de Duncan,  $p=0,05$ ). Controle não estressado: salina (Cs), naltrexona (Cn); estresse agudo: salina (E1s), naltrexona (E1n); estresse crônico: salina (E2s), naltrexona (E2s); estresse agudo+crônico: salina (E1+2s), naltrexona (E1+2n).



**Figura 35:** Efeito do antagonista opióide nor-BNI no estresse agudo (A), crônico (B) e agudo+crônico (C) no tempo de amamentação durante os 10 primeiros minutos (média). (\*) diferença entre Cs e E1s (*post hoc* de Duncan,  $p=0,02$ ). Controle não estressado: salina (Cs), nor-BNI (Cb); estresse agudo: salina (E1s), nor-BNI (E1b); estresse crônico: salina (E2s), nor-BNI (E2b); estresse agudo+crônico: salina (E1+2s), nor-BNI (E1+2b).



**Figura 36:** Efeito do antagonista opióide naloxonazina no estresse agudo (A), crônico (B) e agudo+crônico (C) no tempo de amamentação durante os 10 primeiros minutos (média). (\*) diferença entre Cs e E1s (*post hoc* de Duncan,  $p=0,02$ ). Controle não estressado: salina (Cs), naloxonazina (Cz); estresse agudo: salina (E1s), naloxonazina (E1z); estresse crônico: salina (E2s), naloxonazina (E2z); estresse agudo+crônico: salina (E1+2s), naloxonazina (E1+2z).

## DISCUSSÃO

## **1. Inibição do comportamento maternal pelo estresse**

Após a união das mães aos filhotes, o comportamento maternal normal é caracterizado pelo recolhimento de todos os filhotes, ajeitando-os no ninho, lambendo e estimulando a amamentação pela postura de cifose. Nossos resultados demonstram que o estresse agudo interfere com o comportamento maternal comparado com a situação de controle não estressado. Ratas lactantes que não foram manipuladas durante a primeira semana de lactação, quando colocadas em presença de um macho estranho demoram mais para recolher os filhotes e iniciar a amamentação, e permanecem mais tempo em atividades não maternais, como por exemplo explorando a caixa, e menos tempo amamentando os filhotes. Provavelmente a ativação de interneurônios inibitórios em áreas envolvidas com o comportamento maternal poderia ser responsável pela inibição do comportamento maternal em situações de estresse. Este circuito inibitório do comportamento maternal pode ser observado em fêmeas virgens. O comportamento maternal que surge naturalmente em ratas que gestaram não é observado em ratas virgens quando estas são colocadas pela primeira vez com filhotes. Esta ausência do comportamento maternal em ratas virgens tem sido atribuída à atividade de um circuito neural, no qual a amígdala, por meio de suas projeções para o núcleo hipotalâmico anterior/ventromedial, inibiria o comportamento maternal em nulíparas (Sheehan et al, 2001). O núcleo do leito da estria terminal, o septo ventrolateral e o núcleo pré-mamilar dorsal também poderiam estar envolvidos neste circuito (Sheehan et al, 2001). A ativação da amígdala também inibe a área pré-óptica medial inibindo o comportamento maternal. Lesões na porção córtico-medial da amígdala ou na estria terminal

reduzem a aversão de fêmeas virgens aos filhotes, induzindo assim o início do comportamento maternal (Fleming et al, 1980). É muito provável que a situação de estresse agudo ative este circuito inibitório, inibindo assim o comportamento maternal nas fêmeas expostas a um macho estranho. Os efeitos inibitórios do estresse agudo são mais evidentes durante os primeiros dez minutos de experimento, pois as ratas passam menos tempo amamentando os filhotes e mais tempo em atividades não maternais.

Ratas não estressadas recolhem os filhotes rapidamente, agrupam todos no ninho e posicionam-se sobre os filhotes para iniciar a amamentação. A maternidade provoca mudanças comportamentais nas ratas que permitem a indução destes comportamentos. A gravidez e a lactação induzem mudanças no sistema nervoso, principalmente na área pré-óptica medial, levando a fêmea a cuidar dos filhotes e garantir a sobrevivência da prole. Hasen e Gammie (2005) encontraram que ratas lactantes são mais agressivas contra um intruso que as ratas virgens. Eles demonstraram que diferentes estados reprodutivos são caracterizados por alterações na circuitaria neural que promove a agressão maternal contra um macho intruso, entre elas regiões da amígdala, núcleos do leito da estria terminal dorsal e porções caudais das áreas hipotalâmicas. Estas regiões são ativadas em ratas lactantes diferentemente das virgens na presença de um intruso. Além disso, a presença dos filhotes aumenta a agressão e diminui a latência para o primeiro ataque contra um intruso em fêmeas nos primeiros dias de lactação, aumentando a liberação de ACTH e corticosterona no plasma das mães (Deschamps et al, 2003).

Em experimentos anteriores nós já havíamos demonstrado que a situação de estresse pela presença de um macho estranho no meio interferia com o

comportamento maternal (Medeiros, 2004). Neste experimento, a presença do macho no meio durante o experimento, caracterizando a situação de estresse agudo, parece ser um importante estímulo para gerar respostas do estresse em fêmeas lactantes e induzir mudanças comportamentais, diminuindo o cuidado com os filhotes.

O estresse crônico isoladamente não modifica o comportamento maternal das ratas lactantes. Durante os primeiros minutos de experimento, as ratas submetidas a estresse crônico não apresentam nenhuma diferença de comportamento em relação ao grupo controle. Este modelo de estresse foi baseado no modelo de instabilidade social de Haller et al (1998). Segundo estes autores, a instabilidade social ocasionada, por períodos de superpopulação no meio, é um bom modelo para estressar fêmeas, uma vez que o modelo de derrota pelo confronto com um animal residente agressivo não provocou mudanças dos marcadores fisiológicos do estresse nas fêmeas, como o aumento dos níveis de corticosterona plasmáticos. No entanto, o modelo de instabilidade social que induz estresse em fêmeas não foi capaz de provocar alterações no comportamento maternal nas fêmeas lactantes. Estudos tem mostrado que a lactação induz a atenuação da resposta ao estresse. Por exemplo, fêmeas lactantes apresentam diminuição da responsividade ao estalo acústico comparadas com fêmeas virgens (Walker et al, 1995). A responsividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) a uma variedade de estímulos externos é diminuída (*down regulation*) em ratas gestantes e lactantes (Neumann et al, 2000, Wigger et al, 1999). Esta redução da responsividade ocorre devido a adaptações de vários níveis cerebrais, incluindo regiões límbicas, hipotalâmicas e do tronco encefálico (Neumann et al, 2001). Os opióides parecem ter um efeito inibitório

sobre o eixo HPA, e conseqüentemente da secreção de corticosterona (Wigger et al, 1999). Pode ser devido a esta inibição do eixo HPA que as fêmeas lactantes submetidas a situação do modelo de instabilidade social não apresentem inibição do comportamento maternal.

Interessante notar que as ratas que foram submetidas ao estresse crônico durante os primeiros dias de lactação, quando colocadas com os filhotes na presença de um intruso não apresentam nenhum comprometimento do comportamento maternal evidenciado nas ratas submetidas a estresse agudo isoladamente. Talvez o estresse crônico cause alterações plásticas na circuitaria neural inibitória do comportamento maternal ou no sistema de receptores opióides em áreas cerebrais que inibem o comportamento maternal. Alguns autores já demonstraram que o comportamento maternal é inibido por opióides (Leng et al, 1985, 1987, 1988). O pré-tratamento com morfina crônica afeta os receptores opióides (Miranda-Paiva et al, 2001) e sensibiliza os animais para os efeitos inibitórios dos opióides no estabelecimento do comportamento maternal. Além disso, em determinadas situações, a densidade de receptores opióides nos sítios de atuação sofre algumas alterações. Por exemplo, no período da gestação, em ratas, é observada uma maior densidade de receptores  $\mu$  no hipotálamo, porém seis a oito dias pós-parto essa densidade retorna a valores normais, independente da mãe estar amamentando ou não (Dondi et al, 1991). A área pré-óptica medial também mostra uma alta densidade de receptores  $\mu$  durante a gestação, sendo reduzida no período da lactação (Hammer et al, 1992). Além disso, a gravidez e a lactação provocam adaptações funcionais do sistema neuroendócrino hipotalâmico na reprodução. Wigger et al (1999) encontraram que a liberação de oxitocina dentro do núcleo paraventricular hipotalâmico em

resposta a um estresse físico é inibida por opióides endógenos no final da gravidez, enquanto que em ratas virgens a liberação de oxitocina é estimulada. Redução de receptores opióides, ou mudança na dinâmica dos receptores poderia estimular ou facilitar o comportamento maternal. Kinsley (1994) demonstrou que um aspecto da fisiologia de fêmeas múltiparas em relação às nulíparas é a mudança no sistema opióide endógeno. Em uma série de experimentos o autor achou que uma dose inicial de morfina inibe o comportamento maternal em 88% das fêmeas lactantes primíparas enquanto que somente 38% das múltiparas o comportamento foi inibido. Isso demonstra que mudanças plásticas podem ocorrer e podem significativamente influenciar o comportamento. Assim, a situação de estresse crônico poderia induzir a estas mudanças plásticas do sistema opióide inibitório do comportamento maternal, impedindo que a situação de estresse agudo pela presença do macho estranho interfira no comportamento da fêmea com a ninhada.

Uma das áreas onde os opióides poderiam inibir o comportamento maternal poderia ser a PAG lateral, uma vez que a administração sistêmica de morfina durante a gestação ativa esta região, inibindo o comportamento maternal durante a lactação (Miranda-Paiva et al, 2003). Para verificar se a situação de estresse agudo e crônico ativaria a PAG, e qual coluna estaria envolvida na inibição do comportamento pelo estresse agudo, foi realizada a imunohistoquímica para detecção de Fos.

## **2. Alterações na expressão de Fos nas colunas dorsomedial, dorsolateral e lateral da PAG pelo estresse**

Os resultados encontrados sugerem que a inibição do comportamento maternal pelo estresse agudo está relacionada com a ativação de neurônios da PAG lateral. O gene c-fos pode ser ativado por sinais extracelulares, e a detecção imunohistoquímica de c-fos mostra neurônios que são ativados como resultado de formas particulares de estimulação neuronal (Hughes e Dragunow, 1995). Acredita-se com isso que c-fos seja um importante marcador de ativação neuronal. O aumento da expressão de Fos na PAG lateral mostra a clara correlação entre a inibição do comportamento maternal pela presença do macho e a ativação da PAGl. A atividade do gene usado neste experimento como uma marca de estimulação neuronal também é fundamental para a expressão do comportamento maternal como demonstrado por Stack e Numan (2000). Estes autores mostraram que a expressão de Fos e Fos B na área pré-óptica medial, nos núcleos do leito da estria terminal ventral e no núcleo paraventricular é elevada em ratas lactantes, indicando o papel destes fatores de transcrição na expressão do comportamento maternal. Lonstein et al (1998a) cita que camundongos *knockout* para o gene da família fos são aparentemente normais, exceto por uma profunda deficiência maternal, uma deficiência não devida a mudanças hormonais. Possivelmente um ou mais genes da família fos podem ser necessários para que a mãe responda apropriadamente ao estímulo dos seus filhotes.

A PAG tem um papel multifatorial em ratas parturientes e está envolvida na mediação dos comportamentos de amamentação, sexual, agressivo e resposta

ao medo. Lesões na PAG caudal resultam em aumento da agressividade e aumento da frequência de ataques a um macho intruso (Lonstein et al, 1998b). A PAG contém neurônios que integram o comportamento de defesa (Keay e Bandler, 2001). Estimulações elétrica ou química na PAG geram respostas defensivas, como a reação de congelamento, enquanto que lesões reduzem essa resposta (Misslin, 2003). Neurônios envolvidos no comportamento de raiva defensiva específicos existem dentro da PAG e são necessários para integrar o comportamento de confronto ou fuga (Keay e Bandler, 2001). Estes neurônios contêm diferentes tipos de receptores, e quando são ativados excitam áreas no sistema nervoso e medula espinhal que causam os efeitos autonômicos e somato-motores da resposta defensiva. Adicionalmente, neurônios modulatórios específicos existem na amígdala, núcleo da estria terminal e hipotálamo lateral (regiões envolvidas no comportamento maternal), que fazem sinapse com os neurônios da PAG, modulando a atividade e a intensidade da resposta da raiva defensiva (Greg e Siegel, 2001). A região lateral da PAG é ativada em situações que provocam estratégias ativas, como o confronto ou a fuga com o estímulo estressor (Keay e Bandler, 2001). Esses estímulos são caracterizados por aumento da atividade motora, aumento da vigilância, hiper-reações e mudanças circulatórias como hipertensão, taquicardia e alterações na perfusão regional favorecendo a redistribuição de sangue para leitos vasculares com o aumento da necessidade metabólica. A situação de estresse provocada pelo macho estranho no meio parece provocar reações ativas nas mães, que permanecem mais tempo explorando a caixa e menos tempo em postura de amamentação. Este comportamento ativo observado nas fêmeas submetidas a estresse agudo provocou o aumento de Fos na região lateral da PAG. A ausência do

comportamento exploratório em fêmeas submetidas a estresse crônico e estresse agudo+crônico mostrou também a ausência de ativação da PAGI nestas condições comparadas ao grupo controle.

Além desta ativação da PAG em situações de estresse agudo, a região lateral também parece estar envolvida com a postura de cifose na amamentação. Lonstein e Stern (1998b) em estudos de lesão na PAGI caudal encontraram diminuição na postura de cifose das ratas lactantes, sem afetar outros comportamentos maternos como o recolhimento, a limpeza e a construção de ninho, e além disso houve diminuição do peso dos filhotes, mostrando a importância dessa postura para a eficiência da amamentação. O mecanismo responsável pela postura de cifose é dependente da neurotransmissão gabaérgica. Infusão bilateral de antagonista GABA A (bicuculina) na PAGI promove cifose em resposta a estimulação de sucção dos mamilos, enquanto que infusão de agonista GABA A (muscimol) impede a cifose (Lonstein e Stern, 1998, Salzberg et al, 2002). A sucção dos mamilos provoca cifose pela alteração da inibição gabaérgica da PAG caudal via receptores GABA desses neurônios. Além do envolvimento desta circuitaria gabaérgica existente na PAGI, o aumento da expressão de Fos em situações de estresse pode ser devido também à ativação de vias opióides inibitórias na PAGI. Morfina administrada durante o período de gestação aumenta a expressão de Fos na PAGI e provoca inibição do comportamento materno durante o período de lactação (Miranda-Paiva et al, 2003). Lesões na PAGI previnem a inibição do comportamento materno induzido por morfina no comportamento materno (Sukikara et al, 2006). Possivelmente a PAG tem um papel importante na escolha de comportamento em situações onde há presença de um estímulo estressor, como um macho intruso, sendo ativada e

recrutada para gerar comportamento de defesa e conseqüente proteção da ninhada.

O fator liberador de corticotropina (CRF) tem sido identificado como um componente da ativação do eixo HPA. O CRF dentro do cérebro modula as respostas fisiológicas e comportamentais para os estímulos estressores. Pela estimulação da liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), o CRF ativa um mediador chave na resposta ao estresse. Uma região que contém neurônios e receptores de CRF é a PAG (Bowers et al, 2003). Em altas concentrações o CRF tem um efeito excitatório nos neurônios da PAG e em baixas concentrações ele não produz nenhum efeito significativo nesses neurônios (Bowers et al, 2003). Diversas estruturas límbicas expressam CRF durante situações de estresse agudo e crônico, dentre elas o núcleo central da amígdala (Hand et al, 2002). O núcleo central da amígdala tem efeitos diretos nas mudanças autonômicas, endócrinas e comportamentais durante o estresse. Por exemplo, a estimulação da amígdala central aumenta a freqüência cardíaca e a pressão sanguínea, ativando o eixo HPA (Hand et al, 2002). Neurônios encefalinérgicos estão presentes no núcleo central da amígdala e projetam-se para a PAG. O complexo amigdalóide poderia ser o ponto de convergência de vários estímulos ameaçadores (como a presença do intruso na caixa) e poderia projetar-se para a PAG, que coordena várias respostas do comportamento defensivo.

Estudos mostram que a estimulação elétrica da amígdala ativa receptores opióides dentro da PAG (Greg e Siegel, 2001). A amígdala medial é ativada após a exposição a um estímulo estressante em ratas lactantes, como a presença de um intruso, odor de um predador ou mesmo a presença dos filhotes (Deschamps et al, 2003). Há evidências da participação da amígdala na modulação das

respostas neuroendócrinas e comportamentais ao estresse. Além disso, a amígdala participa ativamente no período da lactação. Ratas lactantes apresentam alta proporção de neurônios responsivos à oxitocina no núcleo medial da amígdala e em menor proporção no núcleo central quando comparadas com ratas virgens e ratas grávidas, indicando que no período periparto há uma relativa ativação da amígdala (Terenzi e Ingram, 2005). Nós podemos sugerir que a situação de estresse agudo poderia ativar a amígdala, que poderia conseqüentemente ativar a região lateral da PAG (pela inibição de interneurônios inibitórios, por exemplo), inibindo o comportamento maternal em ratas nestas condições de estresse.

Outra possibilidade poderia envolver a inibição de neurônios das colunas dorsomedial e dorsolateral da PAG. Arthur et al (1997), utilizando marcadores anterógrados, demonstrou que cada coluna da PAG projeta-se bilateralmente para todas as outras colunas. Nós observamos que ratas submetidas a estresse crônico não apresentaram comprometimento do comportamento maternal, mas tiveram um padrão de diminuição na ativação de neurônios da PAG dorsomedial e dorsolateral. O estresse agudo, após um período de estresse crônico, levou a uma diminuição de ativação neuronal da PAG dorsolateral. Assim, a ausência de ativação dos neurônios da PAG dorsomedial e dorsolateral poderia impedir a ativação de neurônios da coluna lateral, responsável por inibir o comportamento maternal.

Os mecanismos pelos quais a ativação da amígdala ou da PAG dorsomedial e dorsolateral poderiam ativar a PAGl são incertos, mas poderiam ser dependentes da liberação de opióides. Para verificar se há participação dos opióides na inibição do comportamento maternal em situações de estresse, nós

verificamos os efeitos de antagonistas opióides na PAGI nestas condições de estresse. E verificamos também se a inibição do comportamento maternal das ratas nas condições de estresse agudo poderia ser revertido com estes antagonistas opióides.

### **3. Antagonistas opióides na PAGI restabelecem o comportamento maternal normal em ratas estressadas.**

Nossos resultados demonstram que os antagonistas opióides naltrexona (antagonista opióide não seletivo), nor-BNI (antagonista opióide seletivo de receptores  $\kappa$ ) e naloxonazina (antagonista opióide seletivo de receptores  $\mu_1$ ), microinjetados na PAGI, revertem os efeitos do estresse causados pela apresentação de um macho estranho no comportamento maternal. As ratas submetidas a estresse agudo, quando tratadas com os antagonistas opióides, recolhem os filhotes mais rapidamente, iniciam a amamentação mais rápido e aumentam o tempo de amamentação total durante o tempo total do experimento quando comparadas com as ratas que recebem salina. Naltrexona e naloxonazina também diminuem o tempo não maternal em ratas estressadas. Experimentos demonstram que o tratamento com morfina sistêmica interrompe o início do comportamento maternal no período da lactação (Bridges e Grimm, 1982) e reduz a vocalização emitida pelas mães (Kalin et al, 1995). Entretanto, a administração concomitante de naloxona em ratas tratadas com morfina restabelece o comportamento maternal normal, quando comparadas às ratas que receberam somente salina (Bridges e Grimm, 1982). Além disso, o pré-tratamento com naloxona e naloxonazina 24h antes do uso de morfina sistêmica bloqueia o efeito

da morfina na inibição do comportamento maternal (Mann et al, 1990). Assim, o início e a manutenção do comportamento maternal em ratas parece ser regulado por ativação de receptores opióides  $\mu$ .

Naloxona intraperitoneal ou intranasal estimula significativamente reações maternais, como o aumento do número de agachamentos sobre os filhotes e diminuição da latência para transferir os filhotes ao ninho (Dobryakova et al, 2005). Naloxona sistêmica ou i.c.v. não modifica a qualidade dos comportamentos maternais medidos, como o recolhimento dos filhotes, a limpeza, a construção de ninho, o agrupamento ou o agachamento sobre os filhotes, mas leva a uma diferença quantitativa no tempo em que a fêmea permanece no ninho e amamentando os filhotes (Byrnes et al, 2000). Kinsley et al (1995) encontraram que ratas tratadas com naloxona sistêmica passaram mais tempo no ninho e menos tempo com os filhotes e com o estímulo de sucção, sugerindo assim que os opióides tenham um efeito bifásico no comportamento maternal, atraindo as fêmeas para o ninho quando os níveis diminuem mas desviando as ratas do comportamento quando os níveis estão altos.

Em nosso projeto nós utilizamos os antagonistas opióides em ratas não estressadas (grupo controle) e em ratas submetidas a estresse crônico e estresse agudo+crônico para verificar se estes antagonistas causariam alguma modificação no comportamento comparada às ratas tratadas com salina. Entretanto não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, sugerindo que não há nenhum tônus opióide controlando o comportamento maternal na PAG lateral.

O sistema de opióides parece influenciar na amamentação e no tempo que a mãe permanece próximo aos seus filhotes. A sucção dos mamilos libera

endorfina, e este opióide estimula a liberação de prolactina (Kinsley, 1994). Byrnes et al (2000) encontraram que o antagonista naloxona prolonga a duração do período de amamentação e o tempo que a fêmea passa no ninho. Uma possibilidade é que os opióides estão envolvidos no controle dos processos fisiológicos que influenciam o término do período de amamentação, como a termorregulação. Tem sido sugerido que as fêmeas terminam o período de amamentação como resultado do aumento da temperatura corporal. Como os opióides podem aumentar a temperatura corporal, o antagonista naloxona eliminaria esse aumento da temperatura e assim prolongaria a amamentação (Byrnes et al, 2000). Por outro lado, os opióides podem regular o comportamento maternal ao promover satisfação maternal associada com a interação dos filhotes. O bloqueio dessa retroalimentação poderia aumentar a motivação da fêmea em permanecer com os filhotes até a satisfação.

Receptores opióides estão presentes na PAG (Mansour et al, 1995). O uso de naloxona na PAGI também reverteu a inibição do comportamento maternal pela morfina sistêmica (Miranda-Paiva et al, 2003). A morfina é um protótipo de agonista de receptor opióide  $\mu$ , mas também interage com os outros subtipos de receptores opióides. Mann et al (1991), para verificar qual subtipo de receptor opióide seria responsável em inibir o comportamento maternal, utilizou agonistas de receptores  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$  e  $\sigma$  i.c.v., em ratas no 6<sup>o</sup> dia de lactação. Através dos parâmetros do comportamento maternal medido, eles encontraram que somente a ativação de receptores  $\mu$  interrompe o comportamento maternal. Além disso, o uso de DAGO, um potente agonista de receptores  $\mu$ , foi mais potente em inibir o comportamento maternal que a morfina. Apesar destes dados, em nossos experimentos a inibição do comportamento maternal pelo estresse parece resultar

da ativação de receptores opióides  $\mu$  e  $\kappa$ , pois tanto o antagonista não seletivo quanto os antagonistas seletivos tiveram o efeito de reverter a inibição do comportamento maternal pelo estresse. Entretanto, foi observado que somente o antagonista naltrexona teve um efeito imediato nos primeiros minutos do experimento. Talvez este antagonista tenha um efeito mais rápido que os outros.

Os resultados encontrados mostram que vias encefalinérgicas opióides na PAGI são importantes na inibição do comportamento maternal em ratas lactantes submetidas a estresse agudo. A situação de estresse crônico parece não ser suficiente para ativar os circuitos inibitórios do comportamento maternal, mas poderia provocar alterações plásticas que impedem a ativação destes circuitos na inibição do comportamento em situações de estresse agudo.

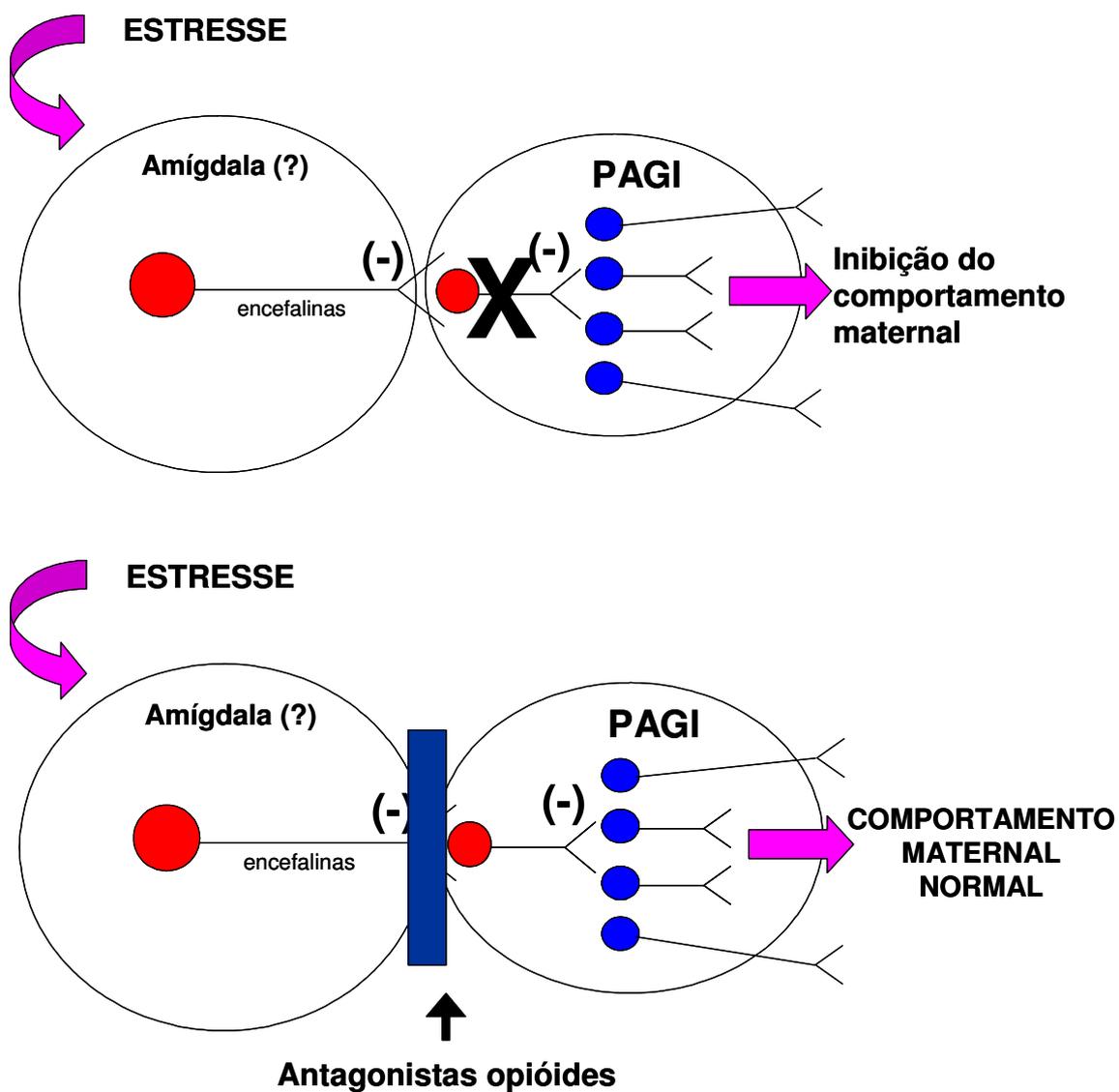
## CONCLUSÕES

A introdução de um macho no ambiente da mãe com a ninhada (estresse agudo) produz prejuízo no comportamento maternal, principalmente no início do período do estresse. Estes animais apresentam maior demora para recolher seus filhotes e iniciar a amamentação, assim como também o tempo total de amamentação está diminuído. Nota-se também que as fêmeas passam mais tempo em atividades não maternais. Por outro lado, fêmeas lactantes submetidas a instabilidade social (estresse crônico) não mostram alterações observáveis nos parâmetros comportamentais estudados. No entanto, a sobreposição de um período de estresse agudo após o estresse crônico resulta no desaparecimento das alterações antes observadas nos animais submetidos somente a estresse agudo.

A ativação de neurônios da PAGI em todos os níveis rostro-caudais examinados parece estar relacionada à inibição do comportamento maternal observado em ratas submetidas a um período de estresse agudo de confronto com um macho intruso. Por outro lado, o estresse crônico leva a um perfil diferente de expressão de Fos, com notável ausência de ativação da PAGI. Um período de instabilidade social (estresse crônico) evita a expressão de Fos na PAGI dos animais subseqüentemente expostos a estresse agudo.

A microinjeção de antagonistas opióides na PAGI reverte os efeitos do estresse agudo, melhorando o progresso do recolhimento, diminuindo a latência para o início da amamentação e aumentando o tempo de amamentação total. Assim, a inibição do comportamento maternal pelo estresse parece estar relacionada à ativação de receptores opióides na PAGI, provavelmente devido à desinibição de uma circuitaria inibitória do comportamento maternal, responsável por ativar a PAGI em situações de estresse agudo. O estresse crônico poderia

promover mudanças plásticas nesta circuitaria, evitando os efeitos deletérios do estresse agudo na ativação da PAGI e na inibição do comportamento maternal.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDLER, R., CARRIVE, P., ZHANG, S. P., 1991. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal gray: viscerotopic, somatotopic and functional organization. *Program of Brain Research*. 87, 269-305.

BEHBEHANI, M. M., 1995. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Progress in Neurobiology*. 46, 575-605.

BLANCHARD, R. J., McKITTRICK, C. R., BLANCHARD, D. C., 2001. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & Behavior*. 73, 261-271.

BOWERS, L. K., SWISHER, C. B., BEHBEHANI, M. M., 2003. Membrane and synaptic effects of corticotropin-releasing factor on periaqueductal gray neurons of the rat. *Brain Research*. 981(1-2), 52-57.

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

BRIDGES, R. S., MANN, P. E., COPPETA, J. S., 1999. Hypothalamic involvement in the regulation of maternal behaviour in the rat: inhibitory roles for the ventromedial Hypothalamus and the dorsal/anterior Hypothalamic areas. *Journal of Neuroendocrinology*. 11, 259-266.

BROWN, R. E., 1998. 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)*. MJR Paranhos da Costa e UV Cromberg, São Paulo, pp 52-99.

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

CALAMANDREI, G., KEVERNE, E. B., 1994. Differential expression of Fos protein in the brain of female mice dependent on pup sensory cues and maternal experience. *Behavioral Neuroscience*. 108(1), 113-120.

COMOLI, E., RIBEIRO-BARBOSA, E. R., CANTERAS, N. S., 2003. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. *Behavioural Brain Research*. 138, 17-28.

DESCHAMPS, S., WOODSIDE, B., WALKER, C. D., 2003. Pups presence eliminates the stress hyporesponsiveness of early lactating females to a psychological stress representing a threat to the pups. *Journal of Neuroendocrinology*. 15, 48-497.

DOBRYAKOVA, Y. V., DUBYNIN, V. A., IVLEVA, Y. A., BELYAEVA, Y. A., KAMENSKII, A., A., 2005. Effect of opioid antagonist naloxone on maternal

motivation in albino rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 140(1), 10-12.

DOBSON, H., SMITH, A., 2000. What is stress and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science*. 60, 743-752.

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

FAROOK, J. M., WANG, Q., MOOCHHALA, S. M., ZHU, Z. Y., LEE, L., WONG, P. T. H., 2004. Distinct region of periaqueductal gray (PAG) are involved in freezing behavior in hooded PVG rats on the cat-freezing test apparatus. *Neuroscience letters*. 354, 139-142.

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

FERREIRA, A., PEREIRA, M., AGRATI, D., URIARTE, N., FERNANDEZ-GUASTI, A., 2002. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiology & Behavior*. 77, 197-204.

FLEMING, A. S., VACCARINO, F., LUEBKE, C., 1980. Amygdaloid inhibition of maternal behavior in the nulliparous female rat. *Physiology & Behavior*. 25, 731-743.

FLEMING, A. S., WALSH, C., 1994. Neuropsychology of maternal behavior in the rat: c-fos expression during mother-litter interactions. *Psychoneuroendocrinology*. 19, 429-443.

GREG, T. R., SIEGEL, A., 2001. Brain structures and neurotransmitters regulating aggression in cats: implications for human aggression. *Program of Neuro-Psychopharmacology and Bio-Psychiatry*. 25, 91-140.

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

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

HAMMER, R. P. J., MATEO, A. R., BRIDGES, R. S., 1992. Hormonal regulation of medial preoptic  $\mu$ -opiate receptor density before and after parturition. *Neuroendocrinology*. 56, 38-45.

HASEN, N.S., GAMMIE, S.C., 2005. Differential fos activation in virgin and lactating mice in response to an intruder. *Physiology & Behavior*. 84, 681-695.

HUGHES, P., DRAGUNOW, M., 1995. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacology Reviews*. 47, 133-178.

JANSEN, A. S. P., FARKAS, E., SAMS, J. M., LOEWY, A. D., 1998. Local connections between the columns of the periaqueductal gray matter: a case for intrinsic neuromodulation. *Brain Research*. 784, 329-336.

KALIN, N. H., SHELTON, S. E., LYNN, D. E., 1995. Opiate systems in mother and infant primates coordinate intimate contact during reunion. *Psychoneuroendocrinology*. 20(7), 735-742.

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

KEER, S. E., STERN, J. M., 1999. Dopamine receptor blockade in the nucleus accumbens inhibits maternal retrieval and licking, but enhances nursing behaviour in lactating rats. *Physiology & Behavior*. 67(5), 659-669.

KINSLEY, C. H., 1994. Developmental psychobiological influences on rodent parental behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 18(2), 269-280.

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

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

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

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., 1988. Endogenous opioid actions and effects of environmental disturbance on parturition and oxytocin secretion in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 84, 345-356.

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

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

LONSTEIN, J. S., SIMMONS, D. A., STERN, J. M., 1998a. Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats. *Neuroscience*. 82(1), 267-281.

LONSTEIN, J. S., SIMMONS, D. A., STERN, J. M., 1998b. Functions of the caudal periaqueductal gray in lactating rats: kyphosis, lordosis, maternal aggression and fearfulness. *Behavioral Neuroscience*. 112(6), 1502-1518.

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

MANN, P. E., PASTERNAK, G. W., BRIDGES, R. S., 1990. Mu 1 opioid receptor involvement in maternal behavior. *Physiology & Behavior*. 47(1), 133-138.

MANN, P. E., KINSLEY, C. H., BRIDGES, R. S., 1991. Opioid receptor subtype involvement in maternal behavior in lactating rats. *Neuroendocrinology*. 53(5), 487-492.

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

MANSOUR, A., FOX, C. A., AKIL, H., WATSON, S.J., 1995. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends of Neuroscience*. 18, 22-29.

MEDEIROS, S., 2004. Envolvimento dos núcleos da estria terminal e amígdala na modulação de reflexos neuroendócrinos e comportamento maternal em ratas. *Dissertação (Mestrado em Neurociências)*, Universidade Federal de Santa Catarina.

MIRANDA-PAIVA, C. M., NASELLO, A. G., FELICIO, L. F., 2001. Morphine pretreatment increase opioid inhibitory effects on maternal behavior. *Brain Research Bulletin*. 55(4), 501-505.

MIRANDA-PAIVA, C. M., RIBEIRO-BARBOSA, E. R., CANTERAS, N. S., FELÍCIO, L., 2003. A role for the periaqueductal gray in opioidergic inhibition of maternal behaviour. *European Journal of Neuroscience*. 18, 667-674.

MISSLIN, R., 2003. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. *Neurophysiologic Clinique*. 33, 55-66.

NEUMANN, I. D., JOHNSTONE, H. A., HATZINGER, M., LIEBSCH, G., SHIPSTON, M., RUSSELL, J. A., LANDGRAF, R., DOUGLAS, A. J., 1998. Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohipophysial changes. *Journal of Physiology*. 508(1), 289-300.

NEUMANN, I. D., TORNER, L., WIGGER, A., 2000. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. *Neuroscience*. 95(2), 567-575.

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

NEVILLE, M. C., MORTON, J., 2001. Physiology and endocrine changes underlying human lactogenesis. *Journal of Nutritional*. 131, 3005-3010.

NUMAN, M., NUMAN, M. J., 1995. Importance of pup-related sensory inputs and maternal performance for the expression of fos-like immunoreactivity in the preoptic area and ventral bed nucleus of the stria terminalis of postpartum rats. *Behavioral Neuroscience*. 109(1), 135-149.

PALANZA, P., 2001. Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neuroscience and Behavioral Reviews*. 25, 219-233.

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

PAVESI, E., MEDEIROS, S., LAZZAROTTO, M., FRANCO, V. K. B., ROCHA, A. C. C., TERENCE, M. G., 2004. Microinjection of opioids agonists into the Bed Nucleus of the Stria Terminalis disrupt maternal behaviour in lactating rats. In: VI Taller em Neurociencias, Córdoba. Livro de resumos do VI taller de neurociencias.

PAXINOS, G., WATSON, C., 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. EUA. Academic Press.

PEDERSEN, C. A., CALDWELL, J. D., WALKER, C., AYERS, G., MASON, G. A., 1994. Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental and medial preoptic areas. *Behavioral Neuroscience*. 108, 1163-1171.

RAMOS, A., MOISAN, M. P., CHAROULOFF, F., MORMÈDE, P., 1998. Estresse: em busca de genes responsáveis pela variabilidade. *Revista de Etologia*. Número especial, 41-52.

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

RUSSELL, J. A., LENG, G., 1998. Sex, parturition and motherhood without oxytocin? *Journal of Endocrinology*. 157, 343-359.

RUSSELL, J. A., LENG, G., BICKNELL, R. J., 1995. Opioid tolerance and dependence in the magnocellular oxytocin system: a physiological mechanism? *Experimental Physiology*. 80, 307-340.

RUSSELL, J. A., 2005. The maternal brain. *Neuroendocrinology briefings*. Disponível em: <[www.neuroendo.org.uk](http://www.neuroendo.org.uk)>. Acesso em 14 Junho 2005.

SALZBERG, H. C., LONSTEIN, J. S., STERN, J. M., 2002. GABA A receptor regulation of kyphotic nursing and female sexual behavior in the caudal ventrolateral periaqueductal gray of postpartum rats. *Neuroscience*. 114(3), 675-687.

SHEEHAN, T., PAUL, M., AMARAL, E., NUMANN, MJ J., NUMANN, M., 2001. Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behaviour in rats. *Neuroscience*. 106(2), 341-356.

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

STACK, E. C., NUMAN, M., 2000. The temporal course of expression of c-fos and fos B within the medial preoptic area and other brain regions of postpartum female rats during prolonged mother-young interactions. *Behavioral Neuroscience*. 114, 609-622.

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

STAFISSO-SANDOZ, G., POLLEY, D., HOLT, E., LAMBERT, K. G., KINSLEY, C. H., 1997. Opiate disruption of maternal behavior: morphine reduces, and naloxone restore, c-fos activity in the medial preoptic area of lactating rats. *Brain Research Bulletin*. 45(3), 307-313.

SUKHOV, R. R., WALKER, L. C., RANCE, N. E., PRICE, D. L., YOUNG III, W. S., 1995. Opioid precursor gene expression in the human hypothalamus. *The Journal of Comparative Neurology*. 353, 604-622.

SUKIKARA, M. H., MOTA-ORTIZ, S. R., BALDO, M. V., FELICIO, L. F., CANTERAS, N. S., 2005. A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. *Journal of Neuroscience*. 26(9), 2583-2589.

TERENZI, M. G., INGRAM, C. D., 2005. Oxytocin-induced excitation of neurones in the rat central and medial amygdaloid nuclei. *Neuroscience*. 134(1), 345-354.

VIANNA, D.M., GRAEFF, F. G., BRANDÃO, M. L., LANDEIRA-FERNANDEZ, J., 2001. Defensive freezing evoked by electrical stimulation of the periaqueductal gray: comparison between dorsolateral and ventrolateral regions. *NeuroReport*. 12(18), 4109-4112.

WAKERLEY, J. B., CLARKE, G., SUMMERLEE, A. J. S., 1994. Milk ejection and its control. In: Knobil, E., Neill, J. D. (ed.) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 1131-1177.

WALKER, C. D., TOUFEXIS, D. J., BURLET, A., 1995. Hypothalamic and limbic expression of CRF and vasopressin during lactation: implications for the control of ACTH secretion and stress hyporesponsiveness. *Program of Brain Research*. 133, 99-110.

WELLMAN, J., CARR, D., GRAHAM, A., JONES, H., HUMM, J. L., RUSCIO, M., BILLACK, B., KINSLEY, C. H., 1997. Preoptic area infusions of morphine disrupt and naloxone restores parenteral like behaviour in juvenile rats. *Brain Research Bulletin*. 44(2), 183-197.

WIGGER, A., LÖRSCHER, P., OEHLER, I., KECK, M. E., NARUO, T., NEUMANN, I. D., 1999. Nonresponsiveness of the rat hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis to parturition-related events: inhibitory action of endogenous opioids. *Endocrinology*. 140(6), 2843-2849.

ANEXOS

## ANEXO A – Coloração de Tetróxido de Ósmio

Primeiramente os cortes foram lavados durante 1 min em H<sub>2</sub>O destilada. Posteriormente foram colocados em solução de Tetróxido de Ósmio (OsO<sub>4</sub>) 0,05% durante 20-60 s. Os cortes foram novamente lavados em água destilada durante 1 min e foram submetidos ao processo de desidratação em álcool (álcool 70% 2min; álcool 90% 2min; álcool 100% duas vezes de 2min cada). Finalmente os cortes foram colocados em xilol duas vezes de 5min cada.

A lâminas permaneceram secando em temperatura ambiente, e foram posteriormente montadas com lamínula com o auxílio de Bálsamo do Canadá (Vetec).

## ANEXO B – Coloração de Giemsa

Os cortes foram colocados em solução de clorofórmio durante 1 h. Após esse período sofreram o processo de rehidratação em álcool 90% (1 min) e em álcool 70% (1 min). Foram lavados durante 1 min em água destilada e foram posteriormente colocados em solução de Giemsa (em temperatura de 70°C) durante 45 min. Após serem lavados em tampão PBS (pH 7,4), os cortes foram fixados em Molibdato de Amônia a 1% durante 5 min. Por fim, os cortes foram passados nos álcoois 70%, 90%, 100%, 100% durante 1 min e 30 seg em cada álcool, e em seguida foram colocados em xilol duas vezes de 5 min cada.

A lâminas permaneceram secando em temperatura ambiente, e foram posteriormente montadas com lamínula com o auxílio de Bálsamo do Canadá (Vetec).

## ANEXO C - Coloração de Nissl

Inicialmente as lâminas foram mergulhadas em água destilada por 10 min. Após essa limpeza, foram colocadas durante 45 min em corante Tionina. Foram lavadas novamente em água destilada em três séries de 3 min cada. Posteriormente as lâminas foram colocadas em álcool 70%, 95% e 3 vezes em álcool 100%, com tempo de 2 min em cada, e finalmente foram colocadas em xilol, duas vezes, com o tempo de 5 min cada.

A lâminas permaneceram secando em temperatura ambiente, e foram posteriormente montadas com lamínula com o auxílio de Bálsamo do Canadá (Vetec).