

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**EFEITOS DA MANIPULAÇÃO E DA SEPARAÇÃO DOS FILHOTES NO  
PERÍODO NEONATAL SOBRE O COMPORTAMENTO DA MÃE**

**Anelise Schindler Todeschini**

**Orientador  
Prof Dr. Aldo Bolten Lucion**

**PORTO ALEGRE, 2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**EFEITOS DA MANIPULAÇÃO E DA SEPARAÇÃO DOS FILHOTES NO  
PERÍODO NEONATAL SOBRE O COMPORTAMENTO DA MÃE**

**Anelise Schindler Todeschini**

**Dissertação apresentada  
ao Programa de Pós-graduação  
em Neurociências da  
Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul como requisito  
parcial para a obtenção do grau  
de Mestre**

**PORTO ALEGRE, 2002**

<a href="#">Lista de figuras</a>	4
<a href="#">Resumo</a>	4
<a href="#">Introdução</a>	6
<a href="#">Resposta de um organismo ao estresse</a>	7
<a href="#">A estimulação neonatal</a>	8
<a href="#">A separação maternal</a>	11
<a href="#">Comportamento maternal</a>	15
<a href="#">Hipótese</a>	20
<a href="#">Objetivo</a>	21
<a href="#">Objetivo geral</a>	21
<a href="#">Objetivo específico</a>	21
<a href="#">Material e métodos</a>	22
<a href="#">Animais</a>	22
<a href="#">Grupos experimentais</a>	22
<a href="#">Seqüência da filmagem do comportamento</a>	23
<a href="#">Comportamentos observados</a>	24
<a href="#">Análise estatística</a>	25
<a href="#">Resultados</a>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<a href="#">Comportamento de lambar os filhotes</a>	31
<a href="#">Comportamento de ficar junto aos filhotes no ninho</a>	32
<a href="#">Amamentação com o dorso arqueado</a>	33
<a href="#">Recolhimento</a>	34
<a href="#">Discussão</a>	39
<a href="#">A relação entre o desenvolvimento e o comportamento maternal</a>	39
<a href="#">Comportamento maternal no grupo manipulado</a>	40
<a href="#">Comportamento maternal no grupo separado</a>	41
<a href="#">Conclusões</a>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<a href="#">Referências Bibliográficas</a>	47

## **Lista de figuras**

Figura 1: Seqüência da filmagem

Figura 2: Modelo de manipulação neonatal

Figura 3: Sala dos registros

Figura 4: Postura cifótica de amamentação

Figura 5: Mãe junto aos filhotes

Figura 6: Comportamento de lambar os filhotes no primeiro, quinto e décimo dia pós-parto.

Figura 7 : Postura cifótica de amamentação no primeiro, quinto e décimo dia pós-parto.

Figura 8: Tempo de permanência no ninho no primeiro, quinto e décimo dia pós-parto.

Figura 9: Latência do recolhimento dos filhotes no décimo dia pós-parto.

## Resumo

A estimulação (manipulação) neonatal tem servido como modelo para observar os mecanismos pelos quais as variações no ambiente do recém-nascido podem afetar seu desenvolvimento quando adulto. Por outro lado, a separação maternal é um modelo que analisa a importância do cuidado parental para o desenvolvimento da prole. Quando adultos, ratos que foram manipulados periodicamente na infância apresentam menor reatividade ao estresse, enquanto aqueles que sofreram privação maternal periódica são mais medrosos e podem apresentar déficits de desenvolvimento e aprendizado. Este trabalho teve por objetivo investigar se a manipulação por 1 minuto ou a separação periódica por 180 minutos dos filhotes no período neonatal poderiam alterar o comportamento da mãe destes filhotes. Avaliou-se o tempo em que a mãe fica em contato com os filhotes, o tempo em que ela fica lambendo-os e a duração do comportamento de amamentação com o dorso arqueado. A duração destes comportamentos foi observada no primeiro, quinto e décimo dia após o nascimento, antes, logo após, 40 e 80 minutos após a manipulação e a separação, sendo que os filhotes foram submetidos a estes estresses durante os primeiros 10 dias pós-parto.

Em conjunto, nossos resultados mostraram que tanto a manipulação por 1 minuto como a separação por 180 minutos aumentaram a duração do comportamento de lambar os filhotes nos primeiros dez dias após o parto. O aumento deste comportamento ocorreu imediatamente após o retorno dos filhotes à caixa, mas não se manteve alto e voltou ao nível do grupo controle após um período de tempo. No grupo manipulado houve uma redução do tempo em que a mãe fica junto aos filhotes logo após a manipulação, comparado aos outros grupos.

Nossos resultados mostram que tanto a estimulação dos filhotes pela manipulação como a privação materna pelo afastamento prolongado provocam aumento do comportamento maternal, expressado pelo comportamento de lambar, logo após o retorno dos filhotes ao ninho.

As alterações comportamentais ou de responsividade ao estresse no adulto, induzidas por eventos ambientais durante o período neonatal (manipulação ou privação materna) podem ser causadas pelo efeito da intervenção direta sobre os filhotes ou pela alteração do comportamento maternal.

## **Introdução**

### ***Resposta de um organismo ao estresse***

Quando um organismo é ameaçado por eventos externos que poderiam causar-lhe algum dano, ele desencadeia uma série de reações que visam manter a homeostasia. Uma das principais respostas ao estresse ocorre pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e das células noradrenérgicas do *Locus Coeruleus*.

Sinais neurais reconhecidos como estresse são levados ao hipotálamo onde ocorre, então, a síntese e secreção do hormônio de liberação da corticotrofina (CRH) e outros peptídeos como a vasopressina pelas células parvocelulares do núcleo paraventricular. Pelo sistema porta esses peptídeos passam do hipotálamo para a hipófise anterior, onde o CRH estimula a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação sistêmica. O ACTH na circulação estimula a liberação de corticóides pela glândula adrenal. O principal glicocorticóide no rato é a corticosterona, que produz lipólise, glicogenólise e o catabolismo de proteínas, mantendo altos os níveis de substratos energéticos no sangue, além de suprimir a resposta imunológica do organismo (Meaney *et al*, 1993).

O eixo HPA possui um sistema de feedback negativo onde os glicocorticóides regulam a liberação de ACTH, agindo também em regiões cerebrais para inibir a liberação do CRH. Além do hipotálamo e da hipófise, o hipocampo também está envolvido no feedback negativo pois é o local onde se encontra a maior densidade de receptores para glicocorticóides (Francis *et al*, 1996).

A atuação dos glicocorticóides no encéfalo de ratos ocorre através de dois tipos de receptores, os receptores tipo I e do tipo II. Os do tipo I são sensíveis a níveis basais do hormônio e ocorrem em maior quantidade no hipocampo. Os do

tipo II são mais sensíveis a alterações da concentração de glicocorticóides como ocorre no estresse, agindo assim na retroalimentação negativa.

### ***A estimulação neonatal***

Ao nascerem, os mamíferos não estão com o sistema nervoso plenamente desenvolvido. Nos ratos, logo após o nascimento, o sistema nervoso está sensível a alterações ambientais. O desenvolvimento de respostas adaptativas ao estresse pode ser modificado por eventos que ocorrem nesta época (Meaney *et al*, 1993).

O período neonatal corresponde ao período onde as primeiras ligações sociais do animal são formadas (Scott, 1962). Neste período o organismo está altamente sensível aos efeitos de estímulos ambientais, como por exemplo a manipulação por parte do experimentador. As alterações comportamentais e neuroendócrinas induzidas pela estimulação neonatal parecem perdurar ao longo da vida do animal (Francis *et al*, 1996).

Muitos pesquisadores observaram que ratos recém nascidos submetidos a choques elétricos ou estresse por frio apresentavam uma baixa ou nenhuma resposta do eixo HPA, comparados aos adultos. Denominaram este período de "período hiporresponsivo ao estresse", pela baixa reatividade corticoadrenal após um estímulo estressante. Zarrow *et al* (1966) demonstrou que filhotes de ratos de 2 dias de idade apresentam elevação significativa da corticosterona plasmática logo após o estresse por calor mas não apresentam elevações depois do estresse por choque. Já com 9 dias de idade, os filhotes não apresentaram elevações significativas após estes dois tipos de estresse em comparação aos níveis basais.

Em ratos de 7, 14 e 21 dias submetidos à manipulação diária ou choque elétrico, aos 8 dias de idade tanto o grupo controle como os estimulados não apresentavam diferenças na corticosterona plasmática em relação ao nível basal após o estresse. Somente a partir do 15º dia que os filhotes começaram a mostrar



elevações deste hormônio após o estresse (Ader *et al*, 1968). Ratos de 5 dias de idade não apresentaram elevação do ACTH em resposta ao estresse por éter (Walker *et al*, 1986). Em estudos mais recentes, observou-se que em resposta a um estresse leve, há uma rápida transcrição do gene do CRH no hipotálamo em ratos com 6 e 12 dias, que foram considerados estarem no período hiporresponsivo ao estresse, mostrando que os filhotes podem ter uma mínima resposta endócrina ao estresse quanto à secreção plasmática de hormônios, mas uma rápida resposta transcricional de CRH no núcleo paraventricular do hipotálamo (Dent *et al*, 2000). Walker *et al* (1986) observou que filhotes adrenalectomizados durante o período hiporresponsivo respondem ao estresse por éter com um aumento significativo do ACTH, indicativo que a baixa resposta do eixo HPA ao estresse durante este período pode ser devido aos filhotes terem uma hipersensibilidade a retroalimentação negativa pela corticosterona.

A estimulação neonatal tem sido usada há várias décadas para observar como as variações no ambiente do recém-nascido podem alterar seu comportamento quando adultos (Denenberg, 1964; Levine *et al*, 1967; Hess *et al*, 1969; Sieck & Ramaley, 1975). A estimulação neonatal consiste essencialmente em separar os filhotes da mãe alguns minutos por dia durante os primeiros dias de vida. Alguns outros modelos já foram testados, por exemplo, segurar os filhotes com a mão gentilmente, expô-los ao frio ou choques elétricos. Comportamentos adultos são afetados pelos estímulos ambientais combinados com a resposta imediata da mãe aos filhotes estimulados (Villescas *et al*, 1977).

Estes estímulos aparentemente não são nocivos aos filhotes, mas podem ser observadas alterações significativas no sistema nervoso central quando adultos. Em ratos adultos que foram separados da mãe por 15 minutos do 2º ao 14º dia de vida o *Locus Coeruleus* contém mais receptores GABA<sub>A</sub> podendo indicar menor atividade noradrenérgica (Caldji *et al*, 2000), além disso, esses animais apresentaram níveis hipotalâmicos de CRH menores do que os controles após um estresse por retenção (Plotsky & Meaney, 1993). A separação por 15 minutos por dia nos primeiros dias mostra aumento das ligações de glicocorticóides no hipocampo expressado pelo aumento da densidade de

receptores tipo II nos adultos. Esta diferença pode influenciar a retroalimentação negativa do eixo HPA, pois o rato manipulado tem uma menor resposta do eixo HPA frente ao estresse (Meaney *et al*, 1993). Além de níveis hormonais e densidade alterados de receptores, algumas estruturas neurais podem ser modificadas pela estimulação neonatal. Ratas manipuladas por 1 minuto por dia, do primeiro ao décimo dia pós-parto, apresentam menos células no *locus coeruleus* durante o período púbere em comparação com ratas não-manipuladas (Winkelman *et al*, 2000). Já machos e fêmeas manipulados por 1 minuto por dia durante os primeiros 5 dias tem um aumento do número de células apoptóticas na amígdala medial neste período (Padoin *et al*, 2000). Por outro lado, o número de células dopaminérgicas dos núcleos paraventricular, periventricular e arqueado do hipotálamo não é diferente em ratos manipulados e não-manipulados (Hermel *et al*, 2001).

No campo aberto, ratos adultos estimulados na infância tendem a ser mais ativos e a defecar em menor quantidade que os não-estimulados, mostrando que os estimulados parecem ter menos medo e secretam menor quantidade de corticosterona após o estresse, além de voltar mais rapidamente aos níveis basais (Denenberg, 1964, Hess *et al*, 1969, Ader & Grotta, 1968). Gilad *et al* (2000), observaram resultados semelhantes em ratos com 53 dias de idade que foram separados 15 minutos duas vezes ao dia no período neonatal. Estes animais mostraram maior índice de exploração e do comportamento de autolimpeza e menor quantidade de defecação. Outras linhagens de ratos geneticamente mais reativos ao estresse, ao serem manipulados do 1º ao 22º dia de vida, mostram quando adultos maior atividade exploratória e menor índice de defecação que ratos de mesma linhagem que não foram manipulados na infância (Fernandez-Teruel *et al*, 1991). Ratos manipulados na infância permanecem mais tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, apresentam menor duração do comportamento de congelar e são menos resistentes a captura quando adultos. A manipulação de ratos no período pós-natal pode afetar a performance em tarefas de aprendizado, além da reatividade ao estresse (Anisman *et al*, 1998). A manipulação neonatal também diminui a inibição comportamental de machos e

fêmeas adultos em um ambiente totalmente aversivo, como o campo aberto com predador (Padoin *et al*, 2001).

A estimulação neonatal também está relacionada a mudanças fisiológicas no comportamento sexual e reprodutivo de ratos adultos, pois fêmeas que foram manipuladas por 1 minuto diariamente nos primeiros 10 dias de vida apresentaram ciclos estrais anovulatórios quando adultas (Gomes *et al*, 1999). Gomes (2001) também observou um retardo na instalação da puberdade em ratas manipuladas por 1 minuto no mesmo período. As mesmas ratas, quando adultas, também apresentaram uma diminuição significativa da frequência de lordoses, quando testadas com machos sexualmente ativos. Em machos adultos manipulados na infância, a frequência de intromissões foi menor que nos não-manipulados além de haver maior quantidade de machos que não copularam no grupo manipulado, indicando o efeito deletério da manipulação neonatal no comportamento reprodutivo de machos (Padoin *et al*, 2001).

A estimulação durante o período neonatal pode inibir a atividade da enzima ornitina decarboxilase (ODC) (Schanberg & Kuhn, 1995). Esta enzima é limitante na síntese das poliaminas e se encontra em alta concentração nas células em divisão de tecidos em crescimento. A ODC também se manifesta nos tecidos em resposta a injeção de glicocorticóide sintético, e em resposta ao estresse. Em ratos de 60 dias, separados 15 minutos duas vezes ao dia, do 2º ao 25º dia de vida, apresentaram menor atividade da ODC induzida pelo corticosteróide sintético dexametasona no hipocampo, mas houve um aumento da ODC no fígado em comparação aos não manipulados (Gilad *et al*, 2000).

### ***A separação maternal***

A separação maternal consiste em afastar os filhotes da mãe por um período maior, que pode variar de 1 a 6 horas por dia, durante os primeiros dias logo após o nascimento. Outro modelo pode ser um único e contínuo período de

24 horas de privação maternal em um determinado dia entre o nascimento e o desmame. Estes modelos são bastante utilizados com a finalidade de observar as reações que podem ocorrer em vários sistemas do organismo, tanto nos filhotes como nos adultos e quais estão envolvidos com o cuidado parental normal.

Longos períodos de separação maternal podem alterar as vias de resposta ao estresse, pois a mãe é a primeira ligação entre o filhote e o meio ambiente (Francis & Meaney, 1999) e a alteração desta relação pode alterar a diferenciação no sistema nervoso dos filhotes. O desenvolvimento do eixo HPA é afetado por eventos que aconteceram no início da vida, durante este período, nos roedores, os receptores de glicocorticóides do hipocampo mostram grande plasticidade (Francis *et al*, 1996).

Ratos com 7 semanas de idade que foram separados da mãe por 4,5 horas nas 3 primeiras semanas de vida apresentaram menor atividade no campo aberto, apesar de secretarem menos corticosterona após o estresse por retenção (Ogawa *et al*, 1994). Adultos separados por 3 horas no mesmo período apresentaram níveis hipotalâmicos de CRH maiores que os não-separados após o estresse por retenção e apresentaram corticosterona plasmática semelhante ao controle. Os ratos que sofreram a separação maternal periódica respondem mais intensamente a um estímulo estressante quando adultos (Plotsky & Meaney, 1993). Estes resultados são confirmados por Wigger & Neumann (1999), em ratos adultos (4 a 5 meses), que sofreram 3 horas de separação maternal diária nas duas primeiras semanas de vida. Após 10 minutos do início do teste do labirinto em cruz elevada, secretaram mais ACTH que o grupo controle, embora os níveis basais não diferissem. Além disto, tanto os machos como as fêmeas mostraram menor atividade exploratória neste teste, permanecendo menos tempo no braço aberto. No entanto, a separação não afetou o comportamento no teste de nado forçado tanto em machos como em fêmeas. Quando adultos, os animais privados do contato maternal mostraram aumento dos comportamentos relacionados com ansiedade, como indicam os testes do labirinto. Biagini *et al* (1998) observaram que ratos separados 5 horas por dia do 2º ao 6º dia pós-parto apresentaram, quando adultos, maior secreção de corticosterona após um estresse por novidade.

Estes ratos também apresentaram uma menor imunorreatividade a receptores de glicocorticóides ativados na área CA1 no hipocampo após o estresse. Sabe-se que os receptores para glicocorticóides no hipocampo estão relacionados com a retroalimentação negativa da resposta ao estresse, então a separação periódica no período neonatal pode causar uma diminuição da eficácia do controle adrenocortical do eixo HPA quando adultos.

O comportamento alimentar também ser afetado pela privação maternal. A separação periódica por 180 minutos nos primeiros dias de vida faz com que machos adultos privados de comida tenham uma latência maior em se aproximar do alimento após a privação, enquanto os que foram manipulados por 15 minutos apresentam menor latência entre os grupos (Iwasaki *et al*, 2000).

Primatas separados da mãe mostraram um aumento significativo em distúrbios comportamentais tais como tremores e gritos (Laudenslager *et al*, 1990) e filhotes de cachorros separados de suas mães por uma noite tiveram uma forte reação emocional (Scott, 1962).

A privação maternal nos primeiros dias prejudica o comportamento reprodutivo nos adultos. Ratos machos adultos separados da mãe por 6 horas diárias no período neonatal apresentaram comportamento sexual reduzido, uma latência maior em montar na fêmea receptiva (Rhees *et al*, 2001).

Esses dados indicam que a separação da mãe na infância faz com que os adultos pareçam ter mais medo em um ambiente novo, como o campo aberto ou o labirinto em cruz elevado (Wigger & Neumann, 1999, Ogawa *et al*, 1994). Ao contrário, a breve estimulação faz com que apresentem menos medo em ambientes novos.

Importantes alterações bioquímicas estão relacionadas a privação do contato maternal. Schanberg & Kuhn (1995) observaram que filhotes de 10 dias separados da mãe por 1, 2 ou 6 horas diminuíram em quase a metade a concentração plasmática de GH comparados ao controle. Mas o GH sérico tende a voltar ao normal se os filhotes forem gentilmente escovados durante a separação. Além disto, a privação maternal faz com que os tecidos percam a sensibilidade ao GH. Ratos com 9 e 16 dias de idade apresentaram uma maior

expressão em células hipotalâmicas e hipocâmpais do fator de crescimento neural (NGF) após um período longe da mãe, que variava de 1 a 3 horas (Cirulli *et al*, 2000).

A separação periódica da mãe durante a fase neonatal pode induzir a uma maior sensibilidade a drogas psicoativas, em ratos adultos, como a anfetamina. Meaney *et al* (2002) examinaram a atividade locomotora no campo aberto em ratos adultos após a administração de anfetamina. Os ratos que sofreram separação materna periódica nas primeiras semanas de vida apresentaram maior locomoção. Este aumento pode estar relacionado ao aumento de glicocorticóides circulantes que induz ao aumento a liberação de dopamina no núcleo accumbens, pois os ratos que sofreram a separação secretam mais corticosterona em ambientes estressantes.

Ratos recém-nascidos afastados da mãe por um período de 24 horas, mantidos na temperatura do ninho, mas sem alimentação mostraram alterações ao longo do desenvolvimento, como o retardo na abertura dos olhos, no aparecimento dos pêlos e na abertura vaginal (Swanson *et al*, 1984). A idade em que ocorre esta separação pode ser crucial na indução de alterações comportamentais e neuroendócrinas na idade adulta. Ratos adultos, machos e fêmeas, separados da mãe por 24 horas nos dias pós-parto 4, 9 e 18 comparados ao controle não apresentaram diferenças na locomoção no teste do campo-aberto, no labirinto em cruz elevado e no teste de medo condicionado. Entretanto, os machos separados no dia 4 pós-parto mostraram déficits no aprendizado de esquiva ativa. Estes dados indicam que uma única separação parece não alterar a reação a medo e novidade, mas sim o aprendizado, e que machos podem ser mais suscetíveis do que as fêmeas (Lehmann *et al*, 1999). Após 24 horas de privação materna e logo após um estresse agudo, o nível de ACTH e de corticosterona plasmática em filhotes de 6 e 12 dias é significativamente mais alto do que aqueles que ficaram com a mãe antes do estresse (Dent *et al*, 2000). Também há uma diminuição da expressão do gene para receptores de glicocorticóides e mineralocorticóides na área CA1 do hipocampo após esta privação do contato materno por 24 horas (van Oers *et al*, 1998).

## ***Comportamento maternal***

O comportamento maternal pode ser definido como o comportamento da fêmea lactante em relação a sua prole imatura. Este comportamento é necessário para o desenvolvimento de todos os mamíferos, que eventualmente se tornarão independentes.

Os filhotes de ratos, assim como a maioria dos roedores, nascem altriciais, isto é, são parcialmente imóveis, desprovidos de pêlos, surdos e cegos, incapazes de se locomover e de regular sua temperatura. Perto da data do parto, a mãe inicia uma seqüência de mudanças comportamentais que visam receber adequadamente os filhotes. Ela muda seus padrões de limpeza corporal, levando mais tempo na limpeza da região mamária e, alguns dias antes do parto, ela constrói um ninho com o substrato disponível (para revisão ver Numan, 1988). Nos ratos, o comportamento maternal ocorre com maior freqüência nos primeiros dez dias após o parto (Grotta & Ader, 1969; 1975) e diminui a partir daí. Até aproximadamente o 12º dia de vida, é a mãe que toma a iniciativa de se aproximar dos filhotes. Após este período, os filhotes estão aptos a se locomover e a deixar o ninho, então são eles que se aproximam da mãe para requerer cuidados (Leon & Moltz, 1971). Nesta idade, a mãe não recolhe mais os filhotes, caso eles saiam do ninho, eles reconhecem a mãe pelos feromônios emitidos pelas fezes desta (Leon, 1974). Depois de duas semanas do nascimento há um declínio gradual dos cuidados maternos, até que ocorra a rejeição dos filhotes pela mãe no desmame (Reisbick *et al*, 1975), que ocorre aproximadamente aos 28 dias de vida.

A fêmea lactante mostra uma ritmicidade do comportamento maternal, que é mais intenso durante o dia (Grotta & Ader, 1969) e caso o ciclo claro-escuro sofra uma inversão a cada 3 dias, a mãe não altera a maioria dos comportamentos em relação aos filhotes, mas altera a periodicidade deste, isto é, ela começa a ter cuidado maternal durante o período escuro e durante o claro também. Caso a

temperatura do ambiente seja aumentada de 18° para 26° C observou-se menos contato com os filhotes (Schelstraete *et al*, 1992). Leon *et al* (1984) demonstrou que a temperatura do ambiente pode influenciar o tempo em que a mãe fica junto aos filhotes. Outros fatores também afetam esta interação, por exemplo, a temperatura dos filhotes, o número e o tamanho destes e o peso da mãe. Concluiu-se que as mães passam mais tempo junto dos filhotes durante o ciclo claro, pois o pico de temperatura materno ocorre durante a noite e a temperatura do ninho limita o tempo em que a mãe fica neste (Leon *et al*, 1984). A hipertermia aguda força a mãe a se afastar dos filhotes (Jans & Leon, 1983 b). Ratas lactantes passam significativamente mais tempo no ninho com filhotes hipotérmicos comparados a filhotes com a temperatura normal de 33° a 35° C (Leon *et al*, 1978).

A rata lactante precisa de vários estímulos além das mudanças hormonais causadas pela gestação em si para estabelecer uma resposta maternal. O principal estímulo é a presença dos filhotes, que atrai a atenção da mãe com alguns comportamentos como vocalizações e movimentos do corpo (Polan & Hofer, 1999) e por estímulos olfatórios (Moore, 1985, Jans & Leon, 1983 a).

Ratas virgens e machos também podem apresentar alguns comportamentos maternos se forem apresentados a filhotes. Este processo é chamado de sensibilização. Se durante alguns dias seguidos forem colocados filhotes perto de ratas virgens ou de machos por alguns minutos, depois de alguns dias, os filhotes serão recolhidos, agrupados e colocados em um ninho (Bridges *et al*, 1974). Fêmeas virgens podem assumir a postura cifótica de amamentação, depois de algum tempo, se receberem o estímulo adequado dos filhotes. A média de tempo para ratas virgens sensibilizarem-se é de 8,5 dias (Lonstein *et al*, 1999). Com o objetivo de estabelecer quais os mecanismos que facilitarão o comportamento maternal, Bridges (1975) testou a sensibilização 25 dias após o parto de ratas que pariram e que ficaram com os filhotes por apenas 4 horas, de ratas que foram submetidas à cesariana e não tiveram contato com os filhotes e de virgens. A sensibilização foi facilitada apenas nas ratas que foram expostas aos filhotes, pelo menos por um pequeno intervalo de tempo. As virgens e as



submetidas à cesariana se comportaram de maneira semelhante, isto é, levaram mais tempo para sensibilizar-se com os filhotes, mostrando que a gestação não é o único estímulo necessário para o estabelecimento de respostas maternas.

Várias alterações hormonais estão envolvidas no comportamento de ratas grávidas e lactantes. O aparecimento do comportamento materno coincide com o parto e hormônios associados com a lactação podem causar este comportamento (Nelson, 1995). Durante a gestação de 21 dias, a progesterona está alta em comparação ao estradiol no mesmo período e atinge seu pico a partir do 14º dia entrando em declínio a partir do 19º dia. O estradiol atinge seu pico no 21º dia da gestação, quando então ocorre o parto. A queda nos níveis de progesterona parece ser necessária para que se iniciem as contrações uterinas. A queda de progesterona e o aumento do estradiol induz a liberação da ocitocina para a expulsão do feto. Depois do nascimento dos filhotes, alguns hormônios facilitam a resposta materno, entre eles o estrogênio, a ocitocina e a prolactina (Numan, 1988, Nelson, 1995) e a corticosterona (Leon *et al*, 1978). Após o parto, o ciclo ovariano normal da rata fica suspenso até o final da lactação (Lonstein *et al*, 1999). Além destas mudanças hormonais, as lactantes tem uma produção crônica de calor neste período. Em um ambiente a 22° C, durante o ciclo claro, a temperatura corporal de lactantes é significativamente mais alta que a de ratas não lactantes, também é mais alta a taxa metabólica. Durante o ciclo escuro a temperatura e a taxa metabólica também se mantém altas (Adels & Leon, 1986). Durante as três primeiras semanas depois do parto é quando a temperatura se mantém mais alta em todo o ciclo reprodutivo (Kitrell & Satinoff, 1988).

Após o parto, a rata lactante se engaja em manter uma série de comportamentos com os filhotes. Na maior parte do tempo ela fica sobre eles, para mantê-los aquecidos (Grotta & Ader, 1969). Ela pode se manter por cima dos filhotes com uma postura arqueada, esta postura curvada faz com que as mamas fiquem mais expostas e facilita a ejeção do leite pelo estímulo de sucção dos filhotes (Stern & Johnson, 1990). Ao parirem, nos primeiros dias de vida dos filhotes, as lactantes passam até 85% do tempo total junto aos filhotes (Grotta & Ader, 1969).

Ao testarem o comportamento maternal de lactantes com filhotes mortos e vivos, Stern & Johnson (1990) observaram que os filhotes devem estar quentes, serem ativos e emitirem vocalizações para que a mãe apresente a postura cifótica de amamentação. Embora elas possam assumir o comportamento de lambar e recolher os filhotes mortos, a postura cifótica só ocorre para filhotes vivos e quentes. Para esta postura, é necessário que os filhotes estejam presos aos mamilos.

Outros comportamentos além da postura cifótica são importantes para assegurar o perfeito desenvolvimento dos filhotes. Entre eles, destaca-se o comportamento de lambar os filhotes. Este comportamento ocorre em todo o corpo e na região anogenital (períneo) tendo a finalidade de estimular a excreção dos filhotes e além disto como reposição de água e eletrólitos da mãe lactante, já que ela ingere a urina dos filhotes (Gubernick & Alberts, 1985). Foi relatado que em uma ninhada de 8 filhotes, a mãe ingere aproximadamente 21 ml de água pela urina dos filhotes, o equivalente a dois terços da água perdida pela lactação em um dia (Friedman & Bruno, 1976). O comportamento de lambar ocorre em alta frequência nos primeiros dias após o parto e Moore & Morelli (1979) constataram que, em ratos, a mãe lambe mais os filhotes no dia 10 pós-parto do que no dia 3, e que a frequência de lambar a região anogenital é maior nos filhotes machos que nas fêmeas. Vários autores sugerem que lambar mais os machos nesta região pode ser induzido por estímulos olfatórios dos filhotes, pois a mãe é mais atraída pela urina dos filhotes machos que das fêmeas (Moore, 1985) mas também pode estar relacionado à quantidade de urina liberada (também ver Moore, 1992). Para testar estas hipóteses, Moore & Power (1992) induziram alterações nas vias sensoriais de lactantes. Ratas tiveram suas células olfatórias lesadas com sulfato de zinco e outras receberam salina 0,9% para beber ao invés de água. Estas ratas tiveram uma redução no comportamento de lambar o períneo dos filhotes, mas a frequência de lambar outras partes do corpo não foi alterada. Apesar da redução nas lambidas, as ratas lesadas com zinco passaram mais tempo no ninho com os filhotes. Estes dados mostraram que os estímulos olfatórios e a quantidade de

urina estão envolvidos no comportamento de lambar, e o comportamento de ficar sobre os filhotes no ninho é afetado pela temperatura e não pelo odor.

O comportamento de lambar os filhotes é um importante estímulo táctil que pode influenciar no desenvolvimento social de machos e fêmeas adultos, incluindo o comportamento sexual (Birke & Sadler, 1987, Moore, 1992). Este comportamento também influencia o comportamento maternal futuro, pois filhotes fêmeas que receberam maior quantidade de lambidas ficarão mais tempo com os filhotes quando forem mães (Francis *et al*, 2000).

Tanto o excesso como a ausência de glicocorticóides circulantes são prejudiciais para o desenvolvimento do sistema nervoso central, sendo que uma quantidade balanceada é necessária para o desenvolvimento normal (Levine, 2001). A concentração de glicocorticóides é naturalmente baixa nos ratos até aproximadamente 14 dias de vida. A presença da mãe tem grande influência nos níveis desta substância, pois após 24 horas de ausência da mãe o rato neonatal responde ao estresse com uma elevação no ACTH e corticosteróide, entretanto se colocado o filhote junto da mãe mesmo anestesiada, esse efeito é revertido (Levine, 1994). Em filhotes de 12 dias, após 24 horas de privação maternal, o ACTH e a corticosterona plasmática foram significativamente mais altos comparados aos filhotes que não foram afastados da mãe. Este efeito foi revertido escovando-se a região anogenital dos filhotes por alguns segundos, periodicamente, durante este tempo de afastamento. Este procedimento faz com que o nível plasmático de ACTH fique semelhante àqueles que não sofreram privação. Esta estimulação táctil de escovação pelo experimentador mimetiza o efeito do comportamento de lambar da mãe (van Oers *et al*, 1998).

O processo normal de crescimento é alterado com a privação maternal, pois a restrição dos estímulos tácteis ao filhotes causa uma queda da ODC em células de vários tecidos, como já foi citado, mas esta queda não está relacionada a falta de amamentação. Schanberg & Kuhn (1995) investigaram respostas bioquímicas que os filhotes de ratos desenvolvem longe da mãe. Os filhotes de fêmeas lactantes que foram anestesiadas por um composto que não impedia a produção e ejeção do leite mas impedia a resposta ativa da mãe para com os filhotes (isto é,

lamber, recolher os filhotes) tinham menor atividade da ODC no encéfalo e no coração comparados àqueles que estavam com a mãe ativa. A estimulação dos filhotes pela mãe, além da alimentação, parece ser necessária para manter normal a atividade desta enzima. O GH também está relacionado a ausência de estímulo táctil em filhotes, pois o nível nos tecidos também decresce com a privação maternal. Os tecidos não respondem ao GH exógeno durante o tempo em que a mãe está longe do filhote. A interrupção do contato maternal é uma experiência estressante que pode levar à supressão do crescimento normal (Kuhn *et al*, 1978 e 1979, Schanberg, *et al*, 1984).

## **Hipótese**

Sabemos que tanto a manipulação como a separação dos filhotes causam mudanças endócrinas, comportamentais e estruturais que persistem ao longo da vida do animal. Estas alterações podem ser devidas a mudanças no comportamento da mãe para com os filhotes quando eles retornam ao ninho, pois a mãe é o primeiro contato do filhote com o ambiente. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento maternal de ratas Wistar cujos filhotes são manipulados ou separados no período neonatal.

## **Objetivo**

### ***Objetivo geral***

Este trabalho tem por objetivo observar se a manipulação neonatal e a separação maternal periódica dos filhotes causa alterações no comportamento maternal da rata lactante frente a seus filhotes.

### ***Objetivo específico***

Observar o comportamento da mãe cujos filhotes sofreram manipulação por 1 minuto e separação por 180 minutos e comparar com fêmeas lactantes cujos filhotes não foram perturbados. Os comportamentos de fêmeas lactantes foram analisados antes, imediatamente, 40 e 80 minutos após o estresse (manipulação ou separação).

O presente trabalho analisou o efeito imediato da manipulação dos filhotes ou da separação materna sobre o comportamento da mãe.

## **Material e métodos**

### ***Animais***

Foram utilizadas ratas prenhas, primíparas, da variedade Wistar, provenientes do biotério da Universidade do Rio Grande do Sul. Estas ratas foram colocadas em caixas de acrílico transparentes (40 x 33 x 25 cm) com maravalha servindo de substrato. Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada de 21°C, ciclo claro-escuro 12-12 horas (início do ciclo claro às 6 h) e água e comida à vontade.

### ***Grupos experimentais***

Ao parirem (Dia 0), as ratas com suas ninhadas foram divididas em três grupos:

- Controle: durante os primeiros 10 dias, os filhotes não foram perturbados ou tocados, com exceção de no dia 2, quando os filhotes foram reduzidos a 8, sem tocar nos outros. No dia 6, a caixa foi limpa, retirando-se o substrato sem tocar nos filhotes ou na mãe.
- Manipulados: a partir do dia 1, os filhotes foram manipulados por 1 minuto por dia até o dia 10. A manipulação consistia em retirar a mãe da caixa residência, colocá-la em uma caixa ao lado, e segurar os filhotes gentilmente com a mão, todos eles juntos, por 1 minuto, depois devolvê-los e a mãe à caixa (Figura 2). O tempo total em que os filhotes ficavam separados da mãe foi aproximadamente 1,5 minutos. A limpeza da caixa ocorreu no dia 6.

- Separados: a partir do dia 1 pós-parto, os filhotes foram separados da mãe por 180 minutos por dia até o dia 10. A separação consistia em retirar os filhotes da caixa e colocá-los, agrupados, em uma incubadora à aproximadamente 32°C por 180 minutos, depois devolvê-los ao ninho.

Os procedimentos de manipulação, separação, limpeza das caixas e retirada dos filhotes excedentes a 8 foram executados durante o ciclo claro. A manipulação e a separação ocorreram em horários aleatórios. Em nenhum momento os filhotes do grupo controle foram tocados pelo experimentador.

### ***Seqüência da filmagem do comportamento***

Os comportamentos da rata lactante com sua ninhada foram registrados em vídeo no 1°, 5° e 10° dia pós-parto, durante o ciclo claro, tendo início aproximadamente às 11:30 hs. A caixa residência foi levada para uma sala (Fig.3) com temperatura de aproximadamente 21° C, onde ocorria a filmagem. Os animais permaneciam na sala de registro por 20 minutos, para adaptação ao novo ambiente. Após este período, iniciava-se a primeira sessão de registro de 10 minutos (R1). Para o grupo controle, foram feitos 4 registros de 10 minutos (R1, R2, R3 e R4) intercalados por intervalos de 30 minutos cada (Fig.1.a). O grupo manipulado também teve 4 registros (R1, R2, R3 e R4) de 10 minutos cada, intercaladas por 30 minutos, entretanto antes do segundo registro ocorria a manipulação por 1 minuto (Fig.1.b). O grupo separado teve 4 registros de 10 minutos (R1, R2, R3 e R4), onde, logo a após o primeiro (R1), ocorria a separação dos filhotes por 180 minutos, e a segundo registro (R2) iniciou assim que os filhotes foram devolvidos à mãe (Fig.1.c).

## ***Comportamentos observados***

Os comportamentos que ocorreram com maior frequência no projeto piloto foram: o comportamento de lambar os filhotes, amamentação com o dorso arqueado, ficar junto aos filhotes no ninho. Outros comportamentos foram observados, mas não foram incluídos na análise estatística por não ocorrerem com muita frequência, e/ou por não serem relacionados com os filhotes, como a autolimpeza da mãe e o recolhimento de um filhote que se afastou do ninho.

Lambar os filhotes inclui lambar o corpo e a região anogenital dos filhotes. A mãe usa as patas dianteiras para virar o corpo do filhote, começando a lambar a região perineal do filhote, que pode urinar em resposta. O comportamento de lambar a região anogenital ocupa mais tempo da mãe do que lambar outras regiões do corpo (Moore, 1992).

Amamentação com o dorso arqueado (Fig. 4) ocorre em resposta ao estímulo na região ventral da mãe pelos filhotes, a mãe curva o dorso, ficando com as pernas e cabeça imóveis, as costas podem estar levemente arqueadas. Se houver um estímulo adicional dos filhotes, já presos nos mamilos, a mãe fica com o dorso em um protuberante arco dorsal e as pernas rigidamente esticadas e imóveis (Stern & Johnson, 1990).

Ficar com os filhotes no ninho (Fig.5) caracteriza-se pela presença da mãe na região do ninho. Ela pode estar sobre os filhotes com o dorso arqueado ou não, pode estar deitada de lado com os filhotes presos aos mamilos, ou pode estar sobre as duas patas traseiras se limpando, mas ao mesmo tempo está em contato com os filhotes.

Para os comportamentos descritos acima o parâmetro utilizado foi a duração de cada comportamento, em cada registro de 10 minutos.

Recolhimento dos filhotes foi registrado sempre no décimo dia. Nos grupos manipulado e separado, os filhotes foram devolvidos à caixa após o estresse, mas colocados no canto oposto ao ninho, e a latência que a mãe levava para recolher o primeiro e o oitavo filhote e devolvê-los ao ninho foi observada. No grupo



controle, após todos os registros do décimo dia, os filhotes foram colocados juntos no canto oposto ao ninho para observar a latência de recolhimento dos filhotes. A mãe explora um pouco a caixa, então se aproxima dos filhotes, cheira-os e então recolhe-os com os incisivos, carregando-os de volta ao ninho. Algumas fêmeas não recolhem os filhotes e outras não levam de volta ao ninho original, mas sim para outro lado da caixa residência, construindo outro ninho.

### ***Análise estatística***

Os parâmetros comportamentais foram expressos como média  $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cada registro (R1: primeiro registro; R2: segundo registro; R3: terceiro registro; R4: quarto registro), foram comparados entre os três grupos através de uma ANOVA de uma via (seguida do teste de Newman-Keuls). Em todos os casos o nível de significância estabelecido foi  $p < 0,05$ .

## Seqüência da filmagem

### a. Grupo controle



### b. Grupo manipulado



### c. Grupo separado

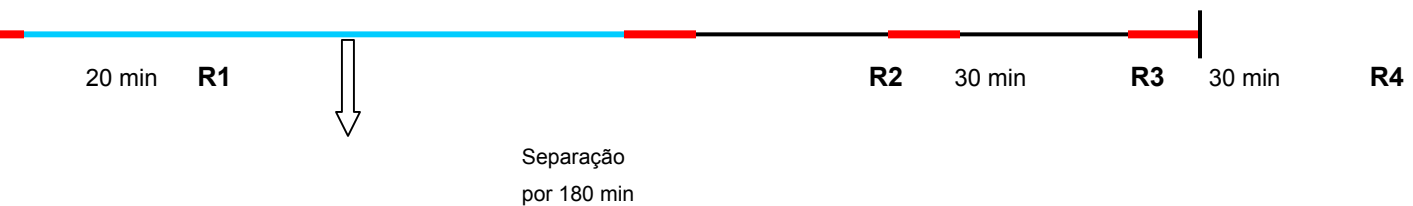


Figura 1. Seqüência da filmagem nos três grupos

**R1**: primeiro registro; **R2**: segundo registro; **R3**: terceiro registro; **R4**: quarto registro. Todos os registros são de 10 minutos cada, intercalados por 30 minutos, com exceção do grupo separado, onde o intervalo entre **R1** e **R2** é de 180 minutos. Cada seqüência de registro ocorreu, para cada grupo, no primeiro, quinto e décimo dia pós-parto.









## Resultados

### *Comportamento de lambe os filhotes*

No primeiro dia pós-parto (Figura 6.a) antes da manipulação e separação a duração do comportamento de lambe nos três grupos não apresentou diferença no primeiro registro (R1), [ $F_{(2,43)}=0,02$ ,  $p=0,97$ ]. No segundo registro (R2), observou-se que no grupo separado, após a devolução dos filhotes, a mãe passa uma grande parte do tempo lambendo-os, mas o grupo manipulado não apresentou diferenças [ $F_{(2,42)}= 6,37$ ,  $p=0,003$ ; teste de Newman-Keuls comparando grupo controle x manipulado  $p=0,9$ , grupo controle x separado  $p=0,004$ ]. Nos registros seguintes (R3 e R4), a duração deste comportamento não apresentou diferenças entre os grupos [ $F_{(2,43)}=0,22$ ,  $p=0,79$ ] e [ $F_{(2,43)}=0,17$ ,  $p=0,83$ ].

No quinto dia pós-parto (Fig. 6.b), houve uma tendência do grupo manipulado lambe mais os filhotes no R1, entretanto, não foi estatisticamente diferente do grupo controle [ $F_{(2,45)}=3,96$ ,  $p=0,02$ ; teste de Newman-Keuls comparando grupo controle x manipulado  $p=0,19$ , controle x separado  $p=0,12$ , manipulado x separado  $p=0,01$ ]. No R2, após o retorno dos filhotes, observou-se que nos grupos manipulado e separado a mãe lambe mais os filhotes comparados ao grupo controle [ $F_{(2,45)}=7,22$   $p=0,001$ ; teste de Newman-Keuls comparando controle x manipulado  $p=0,04$ , controle x separados  $p=0,001$ , manipulados x separados  $p=0,11$ ]. No R3 este comportamento não apresentou diferenças nos três grupos [ $F_{(2,45)}=1,67$ ,  $p=0,19$ ] e manteve-se igual ao grupo controle até o R4 [ $F_{(2,45)}=0,66$ ,  $p=0,5$ ].

No décimo dia (Fig. 6.c), não há diferenças significativas na duração deste comportamento nos três grupos no R1 [ $F_{(2,44)}=0,27$ ,  $p=0,76$ ]. No R2, os grupos experimentais apresentaram um aumento da duração deste comportamento em relação ao grupo controle [ $F_{(2,44)}=12,32$ ,  $p=0,00005$ ; teste de Newman-Keuls

comparando controle x manipulados  $p=0,09$ , controle x separados  $p=0,0001$ , manipulados x separados  $p=0,002$ ] neste registro observou-se que a mãe no grupo separado mostrou maior duração do comportamento de lambe os filhotes que no grupo manipulado. O R3 e o R4 nos grupos experimentais mantiveram-se estatisticamente iguais ao controle [ $F_{(2,44)}=0,38$ ,  $p=0,6$  e  $F_{(2,43)}=0,43$ ,  $p=0,6$ ].

### ***Comportamento de ficar junto aos filhotes no ninho***

No primeiro dia pós-parto (FIG 8.a), o tempo em que a mãe permanece no ninho, em contato com os filhotes é igual nos 3 grupos no R1 [ $F_{(2,43)}=2,6$ ,  $p=0,08$ ]. No R2, este comportamento diminuiu somente no grupo manipulado [ $F_{(2,42)}=8,80$ ,  $p=0,0006$ ; teste de Newman-Keuls comparando controle x manipulado  $p=0,0007$ ]. A partir do R3 este comportamento não é significativamente diferente entre os 3 grupos [ $F_{(2,43)}=1,03$ ,  $p=0,36$ ] e permanece no R4 [ $F_{(2,42)}=1,47$ ,  $p=0,23$ ].

No quinto dia (Fig. 8.b), o R1 não mostra diferença entre os grupos [ $F_{(2,45)}=0,07$ ,  $p=0,93$ ], no R2 observou-se que a mãe nos grupos manipulado fica menos tempo no ninho após a manipulação [ $F_{(2,42)}=8,80$ ,  $p=0,0005$ ; teste de Newman-Keuls comparando controle x manipulados  $p=0,0007$ ]. No R3 a duração deste comportamento no grupo manipulado aumenta e volta a ser semelhante nos 3 grupos e permanece até o R4 [ $F_{(2,45)}=0,67$ ,  $p=0,5$  e  $F_{(2,45)}=2,20$ ,  $p=0,12$ ].

No décimo dia (Fig.8.c), nos três grupos o R1 não apresentou diferença na duração deste comportamento [ $F_{(2,44)}=0,58$ ,  $p=0,5$ ] mas no R2, a mãe dos filhotes manipulados fica menos tempo no ninho após a manipulação [ $F_{(2,44)}=8,10$ ,  $p=0,001$ ; teste de Newman-Keuls comparando controle x manipulado  $p=0,002$ ]. No R3 não há diferença significativa entre os grupos, pois o comportamento mantém-se baixo nos três grupos [ $F_{(2,44)}=0,43$ ,  $p=0,6$ ] mas no R4 este comportamento continua baixo no grupo manipulado [ $F_{(2,43)}=2,49$ ,  $p=0,09$ ; teste de Newman-Keuls comparando controle x manipulados  $p=0,12$ ], enquanto no grupo controle e separado ele tende a aumentar. Observou-se no grupo manipulado, que após o retorno dos filhotes, nos três dias de registro, a primeira resposta da mãe foi



explorar o ambiente, após ter recolhido os filhotes. No grupo separado, após o recolhimento dos filhotes a mãe não se afasta dos mesmos, isto é, durante todos os registros esta mãe apresenta duração do comportamento de ficar junto aos filhotes muito semelhante ao grupo controle.

### ***Amamentação com o dorso arqueado***

No primeiro dia (Fig 7.a) este comportamento apresentou diferenças no grupo manipulado, no R1 [ $F_{(2,40)}=4,31$ ,  $p=0,02$ ; teste de Newman-Keuls comparando controle x manipulado  $p=0,02$ , controle x separado  $p=0,6$ ], e após o retorno dos filhotes à caixa, no R2 [ $F_{(2,40)}=11,32$ ,  $p=0,0001$ ; teste de Newman-Keuls comparando controle x manipulado  $p=0,0002$ , controle x separado  $p=0,18$ ]. No R3 este comportamento se manteve semelhante nos três grupos [ $F_{(2,40)}=0,01$ ,  $p=0,98$ ] assim como no R4 [ $F_{(2,40)}=0,92$ ,  $p=0,4$ ].

No quinto dia (Fig.7.b), no R1 não há diferença na duração deste comportamento nos três grupos [ $F_{(2,42)}=0,8$ ,  $p=0,45$ ]. Para os dois grupos experimentais houve uma redução significativa da duração da amamentação com dorso arqueado após a manipulação e separação [ $F_{(2,42)}=6,79$ ,  $p=0,002$ ; teste de Newman-Keuls comparando controle x manipulado  $p=0,02$ , controle x separado  $p=0,01$ ], mas o R3 e o R4 não apresentou diferenças [ $F_{(2,42)}=0,24$ ,  $p=0,78$  e  $F_{(2,42)}=0,71$ ,  $p=0,5$ ].

No décimo dia (Fig.7.c) a duração deste comportamento no R1 não apresentou diferenças nos grupos [ $F_{(2,41)}=2,73$ ,  $p=0,07$ ], no R2 [ $F_{(2,41)}=1,83$ ,  $p=0,17$ ], R3 [ $F_{(2,41)}=0,28$ ,  $p=0,7$ ] e R4 [ $F_{(2,40)}=2,14$ ,  $p=0,13$ ]. Este comportamento tendeu a manter-se baixo no grupo manipulado neste dia, embora não fosse estatisticamente significativo.

## ***Recolhimento***

A latência do recolhimento do primeiro [ $F_{(2,32)}=0,33$ ,  $p=0,72$ ] e do oitavo filhote [ $F_{(2,32)}=0,004$ ,  $p=0,99$ ] no décimo dia não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação ao controle (Fig. 9. a .e b.). A primeira resposta da mãe após o retorno dos filhotes foi de recolhê-los e devolvê-los ao ninho original, para depois assumir outro comportamento, como o de lambe-los ou assumir a postura cifótica de amamentação, ou mesmo explorar a caixa.

## Duração do comportamento de lambe os filhotes

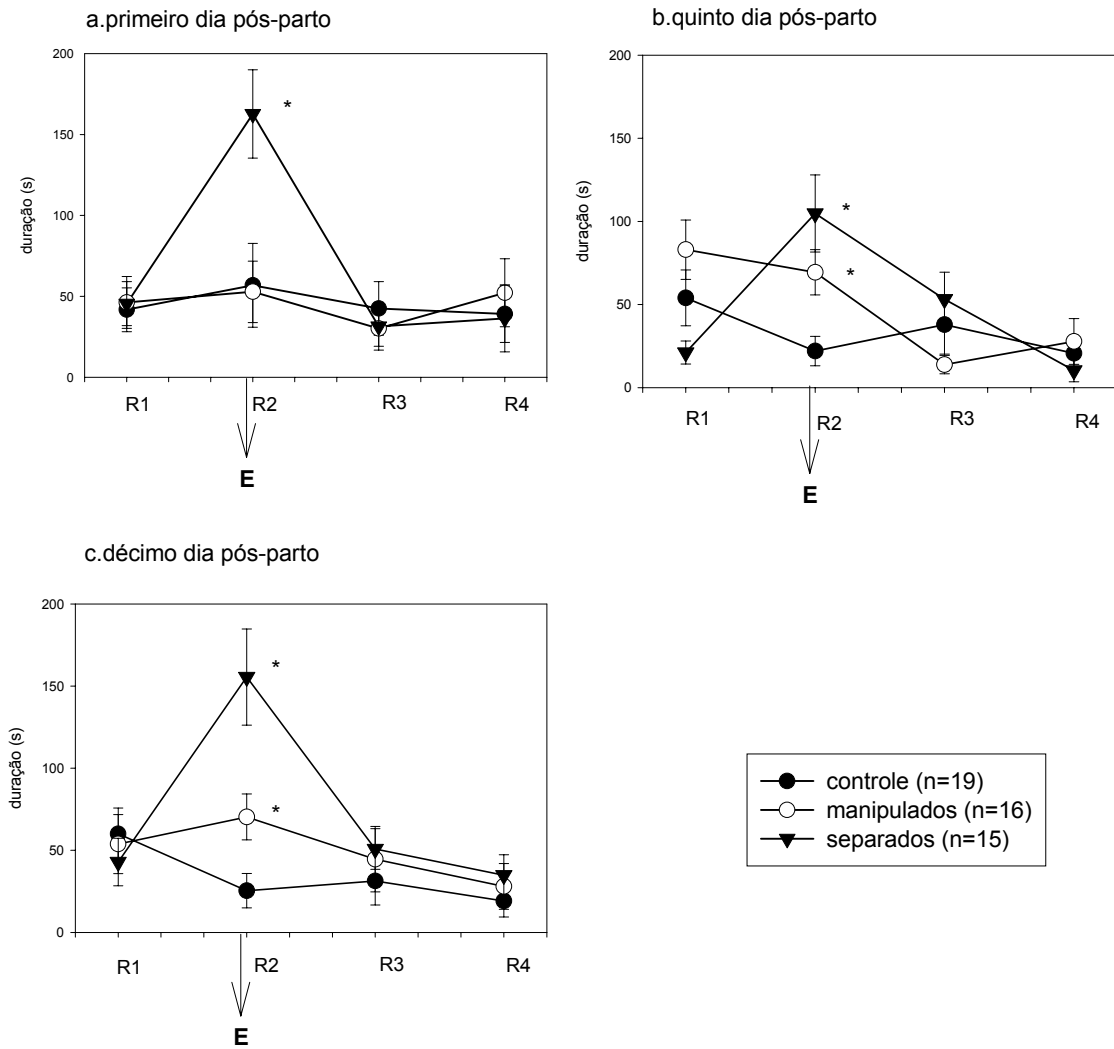


Figura 6. Comportamento materno de ratas com filhotes submetidos à manipulação ou separação desde o primeiro dia pós parto. Duração (s) do comportamento de lambe os filhotes.

\*  $p < 0,05$  (Anova/Neuman-Keuls) comparados ao grupo controle no mesmo registro  
R1= primeiro registro (10 minutos); R2=segundo registro(10 min); R3=terceiro registro (10 min);  
R4=quarto registro (10 min). O intervalo entre os registros foi de 30 min, com exceção de R1  
para R2 no grupo separado, que foi de 180 min. E: estresse (manipulação por 1 minuto ou separação  
por 180 minutos).

## Amamentação com o dorso arqueado

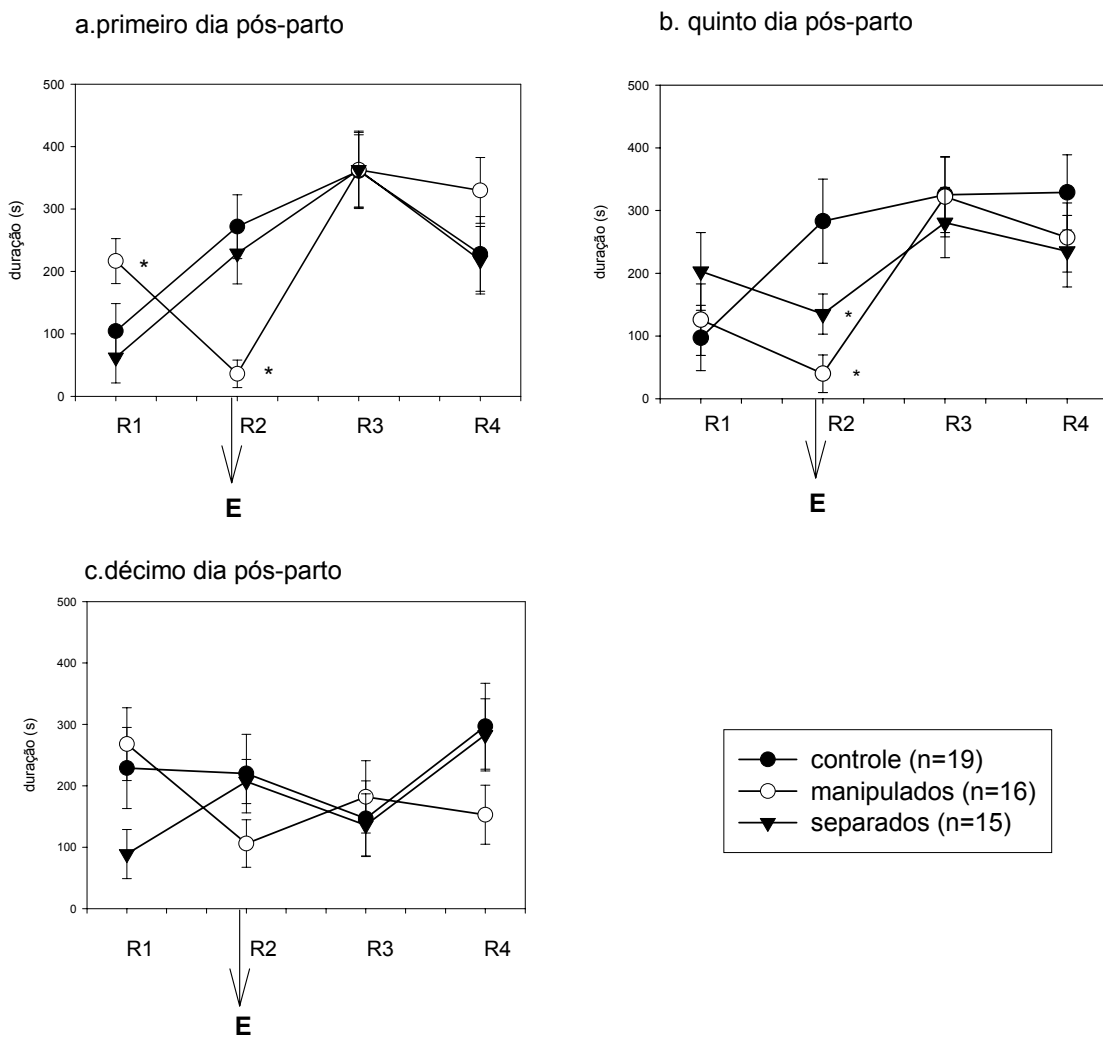


Figura 7. Comportamento materno de ratas com filhotes submetidos à manipulação ou separação desde o primeiro dia pós parto. Duração (s) do comportamento de amamentação com o dorso arqueado.

\*  $p < 0,05$  (Anova/Neuman-Keuls) comparados ao grupo controle no mesmo registro  
R1= primeiro registro (10 minutos); R2=segundo registro(10 min); R3=terceiro registro (10 min); R4=quarto registro (10 min). O intervalo entre os registros foi de 30 min, com exceção de R1 para R2 no grupo separado, que foi de 180 min. E: estresse (manipulação por 1 minuto ou separação da mãe por 180 minutos).

## Ficar no ninho, junto aos filhotes

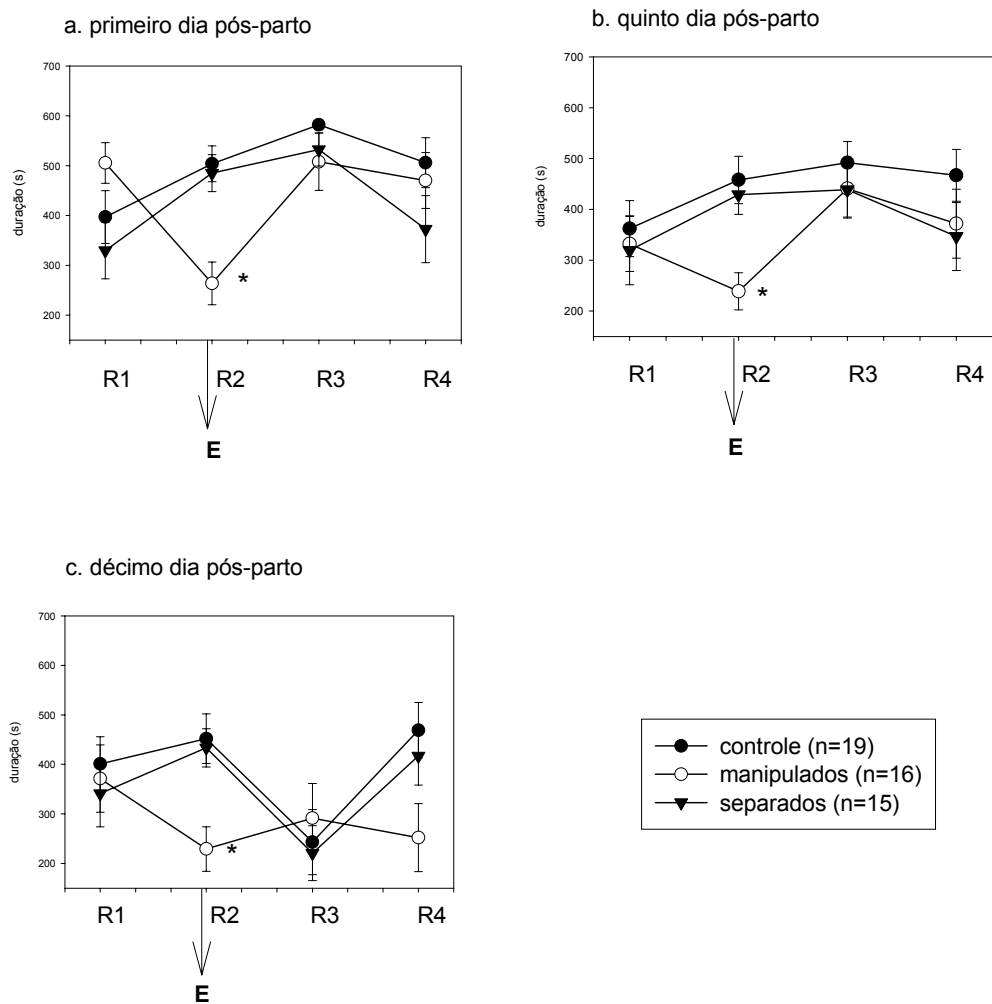


Figura 8. Comportamento materno de ratas com filhotes submetidos à manipulação ou separação desde o primeiro dia pós parto. Duração (s) do comportamento de ficar no ninho, sobre os filhotes.

\*  $p < 0,05$  (Anova/Neuman-Keuls) comparados ao grupo controle no mesmo registro  
R1= primeiro registro (10 minutos); R2=segundo registro(10 min); R3=terceiro registro (10 min);  
R4=quarto registro (10 min). O intervalo entre os registros foi de 30 min, com exceção de R1  
para R2 no grupo separado, que foi de 180 min. E: estresse (manipulação por 1 minuto ou separação  
por 180 minutos).

## Latência de recolhimento do primeiro e do último filhote

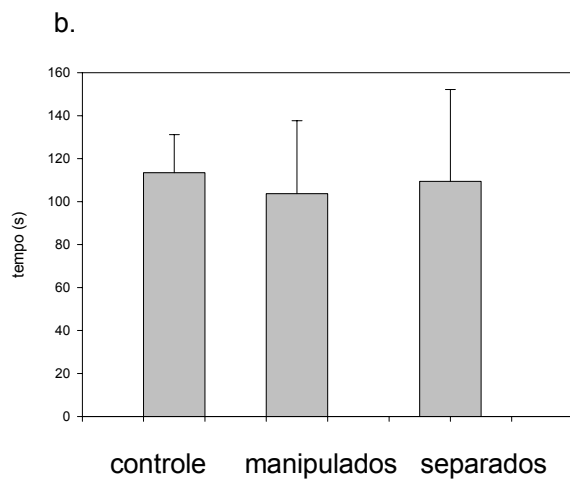
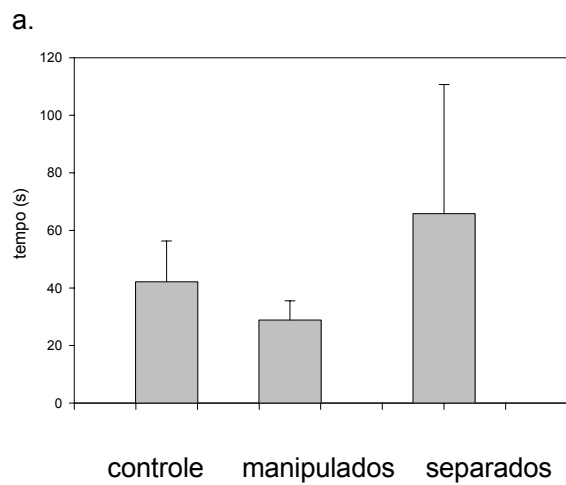


Figura 9. Comportamento materno em ratas. Latência do recolhimento do primeiro e do último filhote no décimo dia pós-parto.

a. Latência do recolhimento do primeiro filhote no décimo dia pós-parto.

b. Latência do recolhimento do oitavo filhote no décimo dia pós-parto.

## **Discussão**

### ***A relação entre o desenvolvimento e o comportamento maternal***

Trabalhos prévios (Caldji *et al*, 1998, Francis *et al*, 1999b, Liu *et al*, 1997) observaram que há diferenças individuais significativas em ratas lactantes quanto a frequência do comportamento de lambar os filhotes e de amamentação com o dorso arqueado nos primeiros dez dias após o parto. Há mães que sem nenhum estímulo, lambem mais e amamentam mais seus filhotes. Os filhotes que receberam cuidados destas mães apresentaram, quando adultos, uma maior sinaptogênese hipocampal e melhor desempenho em atividades de aprendizado (Liu *et al*, 2000). Já filhotes de mães com baixa frequência de lambar e amamentar os filhotes, ao serem criados por mães com alta frequência destes comportamentos, tiveram o mesmo desempenho que os filhotes biológicos destas mães (Francis *et al*, 1999b). A mãe desempenha um importante papel no desenvolvimento das respostas adaptativas ao estresse. Os filhotes que recebem maior quantidade de cuidado maternal apresentam resposta reduzida de corticosterona quando adultos, se submetidos a estresse (Anisman *et al*, 1998). Também apresentam maior atividade no campo aberto e menor latência para iniciar a comer em um novo ambiente (Caldji *et al*, 1998). A duração do comportamento de lambar foi relacionada à resposta do eixo HPA dos filhotes ao estresse por Francis *et al*, 1999a.

O estímulo táctil é muito importante para o desenvolvimento normal na maioria dos mamíferos. Nos ratos, o principal estímulo táctil nos filhotes é o comportamento de lambar o corpo e a região anogenital destes. Este comportamento, descrito como tão importante quanto a amamentação, determina sistemas neurais e altera a plasticidade do sistema nervoso. Este comportamento pode reverter a secreção de ACTH induzida por estresse em filhotes que ficaram 24 horas afastados do contato maternal (Van Oers *et al*, 1998).

A mãe está envolvida em várias respostas fisiológicas dos filhotes, entre elas regular a frequência cardíaca, o ritmo circadiano e a produção do GH (Levine, 2001, Kuhn *et al*, 1978). A diminuição dos níveis da ornitina decarboxilase em células de órgãos como o cérebro e o fígado nos ratos em desenvolvimento está diretamente associada a remoção do comportamento maternal ativo (Kuhn *et al*, 1978)

### ***Comportamento maternal do grupo manipulado***

Vários autores (Francis *et al*, 1999a, Liu *et al*, 1997) observaram que a manipulação dos filhotes por 15 minutos por dia nos primeiros dias de vida induz a uma mudança comportamental na mãe. Ela tem um aumento da frequência comportamento de lambar os filhotes e da amamentação com o dorso arqueado, sem alterar o tempo em que fica no ninho, comparado com o grupo não-manipulado. Os resultados do presente trabalho confirmam o aumento do comportamento de lambar os filhotes no quinto e décimo dia pós-parto logo após o retorno destes ao ninho, no entanto este aumento parece ser transitório, pois nos registros seguintes eles voltaram a ser semelhantes ao controle. Além disto, tanto no quinto como no décimo dia não se observaram diferenças nos registros anteriores à manipulação, mostrando que aparentemente esta estimulação por 1 minuto não induziu a uma alteração constante deste comportamento da mãe.

Vários trabalhos têm mostrado uma importante relação entre os efeitos da manipulação neonatal e o comportamento maternal na indução de alterações comportamentais nos adultos. Ratos manipulados nos primeiros dias de vida, quando adultos, apresentam comportamentos semelhantes àqueles de filhotes que foram criados por mães com alta frequência do comportamento de lambar e amamentar os filhotes com a postura arqueada (Caldji *et al*, 1998). Para um filhote de rato, os primeiros dias de vida não apresentam uma grande variedade de estímulos, e estes estímulos vêm da mãe e do resto da ninhada, então parecem



ser consistentes os dados em que uma alteração no comportamento da mãe possa ter um impacto decisivo no desenvolvimento (Francis & Meaney, 1999). Esses achados apoiam a idéia que a mãe é uma mediadora da manipulação neonatal. A manipulação dos filhotes alteraria o comportamento maternal que por sua vez alteraria o desenvolvimento do filhote. A alteração do cuidado maternal pode ter influenciado o desenvolvimento de sistema neurais relacionados ao medo. A maior freqüência dos comportamentos de lambar os filhotes e da amamentação com o dorso arqueado está relacionada ao aumento da densidade de receptores benzodiazepínicos na amígdala e no locus coeruleus em ratos adultos, podendo ser esta a razão da diminuição do medo em ambientes novos (Caldji *et al*, 1998). A plasticidade dos sistemas neurais envolvidos nas respostas ao medo pode ser um reação adaptativa aos desafios ambientais.

A manipulação, mesmo não sendo um estresse muito intenso e não podendo ser considerada uma privação maternal já que a mãe normalmente passa até 25 minutos em intervalos fora do contato com os filhotes nos primeiros dias pós-parto, aumenta as vocalizações dos filhotes, pois é uma interferência na relação normal mãe-filhote. Este aumento nas vocalizações pode estar relacionado ao aumento da resposta maternal (Caldji *et al*, 1998).

### ***Comportamento maternal no grupo separado***

Como citado anteriormente, a separação prolongada dos filhotes leva a efeitos comportamentais e neuroendócrinas distintos daqueles da manipulação na vida adulta, como mais medo e maior secreção de corticosteróides frente a ambientes novos (Biagini *et al*, 1998, Francis & Meaney, 1999).

Nossos resultados demonstraram que no grupo separado, a primeira resposta da mãe após os filhotes retornarem à caixa residência é lambê-los. Este comportamento pode ser observado desde o primeiro dia pós-parto e parece ser muito acentuado, mais do que no grupo manipulado, principalmente no décimo

dia, onde a diferença entre eles foi significativa. Este comportamento pode indicar uma resposta da mãe ao longo tempo em que os filhotes ficaram sem contato maternal, entretanto este aumento abrupto do comportamento de lambar parece ser transitório, como pôde ser observado nos nossos resultados, pois nos registros subseqüentes ao retorno dos filhotes, o comportamento tendeu a voltar a níveis semelhantes ao controle. Caldji *et al* (2000) observaram que a privação dos filhotes não induz a um aumento da resposta maternal, pelo contrário, a mãe dos filhotes separados tem uma diminuição da freqüência do comportamento de lambar e de amamentação com a postura arqueada. Os resultados do presente trabalho mostraram um aumento da duração do comportamento de lambar os filhotes logo após o retorno destes para a caixa e não altera o tempo em que a mãe permanece na postura arqueada. Nossos resultados vão de encontro aos resultados de Caldji *et al* (2000), apesar de terem sido observados as mesmas variáveis, o parâmetro de observação comportamental usado no trabalho citado foi a freqüência destes comportamentos e não a duração, o que poderia explicar em parte, as diferenças entre os nossos resultados e os dados da literatura.

Liu *et al* (1997) e Caldji *et al* (1998) fizeram observações a cada 4 minutos durante 6 horas durante o período claro, e duas horas durante o período escuro, observando a freqüência em que a mãe apresenta o comportamento de lambar e da amamentação com o dorso arqueado. Já nossos objetivos foram observar a resposta imediata da mãe, utilizando a duração do comportamento maternal dentro de um determinado período de tempo, antes e após a manipulação ou separação dos filhotes e não a freqüência. Os protocolos usados podem explicar os conflitos nos resultados deste trabalho em relação aos dados de Liu *et al* (1997) e Caldji *et al* (1998), como por exemplo, a diminuição do comportamento de dorso arqueado no grupo manipulado e o aumento do comportamento de lambar no grupo separado após o retorno dos filhotes.

O aumento do comportamento de lambar observado na mãe após o período de privação por 3 horas pode ser, em parte, devido ao papel que os filhotes tem para induzir o aumento da resposta maternal. Neste sentido, Polan e Hofer (1999) demonstraram que a privação da mãe por algumas horas aumenta as atividades

dos filhotes direcionados a mãe, como se arrastar em direção a ela e pressionar o focinho na região ventral, assim como as vocalizações. Brake e Hofer (1980) também demonstraram que após a privação maternal os filhotes sugam com mais frequência e intensidade as mamas, mesmo que após 6 horas de privação seus intestinos não estejam vazios (Kacsoh *et al*, 1990).

Em organismos adultos, os glicocorticóides tem uma ampla variedade de funções regulatórias, entre elas, a resposta do organismo ao estresse. Entretanto nos primeiros dias pós-parto, a concentração de corticosterona nos filhotes fica em níveis baixos até aproximadamente o 14º dia de vida (Levine, 2001). Durante o desenvolvimento ou mesmo na vida adulta, a administração de glicocorticóides tem efeitos irreversíveis, podendo causar danos sobre o SNC, como a perda de neurônios hipocámpais (Bohn, 1980, Sapolsky *et al*, 1985). Após 24 horas de privação do contato maternal, a corticosterona basal está elevada nos filhotes, esta elevação pode ser revertida escovando-os na região anogenital e alimentando-os (apenas alimentar os filhotes não reverte esta elevação hormonal) (van Oers *et al*, 1998). A ausência da mãe leva os filhotes que normalmente estão em um período de baixa sensibilidade do eixo HPA ao estresse a se tornarem mais responsivos ao estresse (Levine, 2001). Walker *et al* (1991) demonstraram que o período hiporresponsivo ao estresse não é absoluto e sim dependente do estímulo usado e de qual componente é medido (Walker *et al* 1991, van Oers *et al*, 1998), além disto, filhotes que permanecem junto da mãe apresentam pouca ou nenhuma alteração endócrina em resposta ao estresse (van Oers *et al*, 1998).

Suchecki *et al* (1993) também demonstraram que a privação maternal é relevante nas respostas ao estresse em filhotes. Após 24 horas de privação maternal os filhotes de 9 e 11 dias respondem com uma elevação significativamente maior do ACTH em comparação aos filhotes que permaneceram junto da mãe. Estes resultados mostraram que os filhotes são capazes de desenvolver uma resposta hormonal a estressores leves, como injeção de salina, somente se não estiverem em contato com a mãe.

Experimentos relacionados ao GH sérico em ratos de 2 e de 8 dias de vida, demonstraram que interações entre a mãe e o filhote são necessárias para manter

altos os níveis deste hormônio, e que os filhotes são capazes de distinguir entre a estimulação maternal e a estimulação artificial (escovar gentilmente o filhote, pelo experimentador) e que a concentração normal de GH sérico deve-se ao contato ativo da mãe, mesmo que ela esteja impossibilitada de amamentar por ligação das mamas (Kacsoh *et al*, 1998). Rosenfeld *et al* (1992) constataram que filhotes de ratos com 12 dias de idade separados por 8 horas apresentaram um aumento da corticosterona plasmática após o estresse por novidade e por injeção salina. Walker *et al* (1991) demonstraram que filhotes de 1, 5 e 10 dias são capazes de responder a alguns estressores com um aumento da corticosterona plasmática.

De acordo com o objetivo deste trabalho, que foi de investigar o papel da resposta maternal sobre as alterações fisiológicas e comportamentais da manipulação e da separação maternal, constatou-se que a mãe tem uma resposta inicial quando ocorre o retorno dos filhotes e que esta resposta não aparenta ser duradoura. Após um certo período, que foi medido em registros intercalados por 30 minutos, a resposta inicial da lactante, que tanto na manipulação como na separação é o aumento do comportamento de lambar, tendeu a diminuir e voltar a valores não diferentes do grupo controle. O aumento do comportamento de lambar os filhotes após uma separação por 3 horas pode ser uma resposta compensatória da mãe. A função deste comportamento parece ser seletivo para inibir reações de estresse dos filhotes, que se não fossem privados da mãe não apresentariam resposta hormonal após um estímulo estressante, como foi constatado em vários trabalhos (van Oers *et al*, 1998, Kuhn *et al*, 1978, 1979, Schanberg & Kuhn, 1984). A presença da mãe é necessária para suprimir a resposta do eixo HPA nos filhotes submetidos ao estresse, pois durante o período hiporresponsivo ao estresse a separação maternal prolongada resulta em uma desinibição do padrão normal do eixo HPA, que caracteriza o rato recém-nascido (Levine, 2001). O aumento do comportamento de lambar também pode ocorrer para impedir que os filhotes fiquem com níveis abaixo do normal de alguns hormônios, como o GH.

Nossos resultados demonstraram que os comportamentos das mães dos filhotes manipulados e separados não são diferentes entre si, mas somente diferem em relação ao controle. Esses dados podem por em dúvida as afirmações

de que as alterações comportamentais e neuroendócrinas dos animais manipulados e separados sejam devidas apenas às mudanças da resposta maternal após o retorno dos filhotes ao ninho.

Considerando que os efeitos comportamentais e neuroendócrinos de ratos manipulados no período neonatal seriam de fato decorrentes da alteração do comportamento maternal induzida por aquela intervenção do experimentador é difícil explicar porque as alterações desenvolvidas pela separação são diferentes daqueles da manipulação se a reação da mãe a ambos os procedimentos é a mesma. Podemos sugerir que no caso da manipulação o comportamento da mãe sobrepassa o efeito da manipulação em si. No caso da separação a mãe também atua no sentido de reverter o efeito da privação dos filhotes, no entanto, o resultado observado na vida adulta decorre essencialmente do efeito deletério da separação, que o aumento do comportamento da mãe não foi capaz de reverter.

A manipulação, a interação mãe-filhote, a interação filhote-filhote e as variações no ambiente físico do ninho contribuem conjuntamente para que estes animais apresentem as diferenças comportamentais quando adultos.

## Conclusões

Nossos resultados indicam:

- Que a manipulação dos filhotes pode aumentar o comportamento de lambe os filhotes, mas reduz a permanência da mãe no ninho e o tempo de amamentação com o dorso arqueado.
- Que a separação dos filhotes por 180 minutos é um potente eliciador do comportamento maternal desde o primeiro dia, aumentando a duração do comportamento de lambe, sem afetar o tempo de permanência com os filhotes.
- Que estas alterações comportamentais da mãe num período de 90 minutos, após a manipulação ou separação, são transitórias, voltando ao normal após um certo período de tempo, no mesmo dia.
- Que tanto como a manipulação, quanto a separação fazem com que a mãe tenha a mesma resposta com os filhotes após o retorno destes à caixa.
- A mãe pode ter um papel decisivo nos efeitos da manipulação neonatal, no entanto, no caso da separação maternal, o tempo em que o filhote permanece privado do contato da mãe também é importante para as respostas ao estresse quando adultos.

## Referências Bibliográficas

- ADELS, L., LEON, M. Thermal control of mother-young contact in norway rats: Factors mediating the chronic elevation of maternal temperature. **Physiology & Behavior** 36:183-196. 1986.
- ADER, R., FRIEDMAN, S.B., GROTA, L.J., SCHAEFER, A. Attenuation of the plasma corticosterone response to handling and electric shock stimulation in the infant rat. **Physiology & Behavior** 3:327-331. 1968.
- ADER, R., GROTA, L.J. Effects of early experience on adrenocortical reactivity. **Physiology & Behavior** 4:303-305. 1969.
- ANISMAN, H., ZAHARIA, M.D., MEANEY, M.J., MERALI, Z. Do early life permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? **International Journal of Developmental Neuroscience** 16:149-164. 1998.
- BIAGINI, G. PICH, E.M., CARANI, C., MARRAMA, P., AGNATI, L.F. Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive periods enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. **International Journal of Developmental Neuroscience** 16:187-197. 1998.
- BRAKE, S.C., HOFER, M. A. Maternal deprivation and prolonged suckling in the absence of milk alter the frequency and the intensity of suckling responses in neonatal rat pups. **Physiology & Behavior** 24:185-189. 1980.
- BIRKE, L.I.A., SADLER, D. Differences in maternal behavior of rats and the sociosexual development of the offspring. **Developmental Psychobiology**, 20(1): 85-99. 1987.
- BOHN, M.C. Granule cell genesis in the hippocampus of rats treated neonatally with hydrocortisone. **Neuroscience** 5:2003-2012. 1980.
- BRIDGES, R.S. Long-term effects of pregnancy and parturition upon maternal responsiveness in the rat. **Physiology & Behavior** 14:245-249. 1975.

- BRIDGES, R.S., ZARROW, M.X., GOLDMAN, B.D., DENENBERG, V.H. A developmental study of maternal responsiveness in the rat. **Physiology & Behavior** 12:149-151. 1974.
- CALDJI, C., TANNENBAUM, B., SHARMA, S., FRANCIS, D., PLOTSKY, P.M., MEANEY, M.J. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 95:5335-5340. 1998.
- CALDJI, C., FRANCIS, D.D., SHARMA, S., PLOTSKY, P.M., MEANEY, M.J. The effects of early rearing environment on the development of GABA<sub>A</sub> and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. **Neuropsychopharmacology**, 22(3): 219-229. 2000.
- CIRULLI, F., ALLEVA, E., ANTONELLI, A., ALOE, L. NGF expression in the developing rat brain: effects of maternal separation. **Developmental Brain Research** 123: 129-134. 2000.
- DENENBERG, V.H. Critical periods, stimulus input and emotional reactivity: a theory of infantile stimulation. **Psychological Review** 51(5):335-351. 1964.
- DENENBERG, V.H. Commentary: Is maternal stimulation the mediator of the handling effect in infancy? **Developmental Psychobiology** 34:1-3. 1999.
- DENT, W.G., SMITH, M.A., LEVINE, S. Rapid induction of corticotropin releasing hormone gene transcription in the paraventricular nucleus of the developing rat. **Endocrinology**, 141(5):1593-1598. 2000.
- FERNANDEZ-TERUEL, A., ESCORIHUELA, R.M., TOBENA, A., BATTIG, K. Infantile (handling) stimulation and behavior in young roman high- and low-avoidance rats. **Physiology & Behavior**, 50:563-565. 1991.
- FRANCIS, D.D., CHAMPAGNE, F.C., MEANEY, M.J. Variations in maternal behavior are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. **Journal of Neuroendocrinology**, 12:1145-1148. 2000.
- FRANCIS, D.D., CHAMPAGNE, F.C., LIU, D., MEANEY, M.J. Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. **Annals New York Academy of Sciences**, 896:66-84. 1999. (a)



- FRANCIS, D.D., DIORIO, J., LAPLANTE, P., WEAVER, S., SECKL, J.R., MEANEY, M.J. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. **Annals New York Academy of Sciences**, 794:136-152. 1996.
- FRANCIS, D.D., DIORIO, J., LIU, D., MEANEY, M.J. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. **Science** 286:1155-1158. 1999. (b)
- FRANCIS, D.D., MEANEY, M.J. Maternal care and the development of stress responses. **Current Opinion in Neurobiology** 9(1): 128-134. 1999.
- FRIEDMAN, M.I., BRUNO, J.P. Exchange of water during lactation. **Science** 191:409-410. 1976.
- GILAD, V.H., RABEY, J.M., ELIYAYEV, Y., GILAD, G.M. Different effects of acute neonatal stressors and long term postnatal handling on stress-induced changes in behavior and in ornithine decarboxylase activity of adult rats. **Developmental Brain Research**, 120: 255-259. 2000.
- GOMES, C.M. Efeito da estimulação neonatal sobre o sistema reprodutor feminino. Dissertação de mestrado, 2001.
- GOMES, C.M., FRANZ, P.J., SANVITTO, G.L., ANSELMO-FRANCI, J.A., LUCION, A.B. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 32: 1239-1242. 1999.
- GROTA, L.J., ADER, R. Continuous recording of maternal behavior in *Rattus norvegicus*. **Animal Behavior** 17: 722-729. 1969.
- GROTA, L.J., ADER, R. Behavior of lactating rats in a dual chambered maternity cage. **Hormones and Behavior** 5: 275-282. 1975.
- GUBERNICK, D.J., ALBERTS J.R. Maternal licking by virgin and lactating rats: water transfer from pups. **Physiology & Behavior** 34: 501-506. 1985.
- HESS, J.L., DENENBERG, V.H., ZARROW, M.X., PFEIFER, W.D. Modification of the corticosterone response curve as a function of handling in infancy. **Physiology & Behavior** 4: 109-111. 1969.

- HENNING, S.J., CHANG, S.P., GISEL, E.G. Ontogeny of feeding controls in suckling and weanling rats. **American Journal of Physiology** 237:R187-R191. 1979.
- HERMEL, E.E.S, SEVERINO, G.S., CECCONELLO, A.L., SANVITTO, G.L., LUCION, A.B. Neonatal handling and the expression of immunoreactivity to tyrosine hydroxylase in the hypothalamus of adult male rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 34:1191-1195. 2001.
- IWASAKI, S., INOUE, K., KIRIIKE, N., HIKIJI, K. Effect on maternal separation on feeding behavior of rats in later life. **Physiology & Behavior** 70:551-556. 2000.
- JANS, J.E., LEON, M. Determinants of mother young contact in norway rats. **Physiology & Behavior** 30:919-935. 1983.(a)
- JANS, J.E., LEON, M. The effects of lactation and ambient temperature on the body temperature of female norway rats. **Physiology & Behavior** 30:959-961. 1983. (b)
- KACSOH, B., MEYERS, J.S., CROWLEY, W.R., GROSVENOR, C.E. Maternal modulation of growth hormone secretion in the neonatal rat: involvement of mother-offspring interactions. **Journal of Neuroendocrinology** 124:233-240. 1990.
- KITTRELL, E.M.W., SATINOFF, E. Diurnal rhythms of body temperature, drinking and activity over reproductive cycles. **Physiology & Behavior** 42:477-484. 1988.
- KUHN, C.M., BUTLER, S.R., SCHANBERG, S.M. Selective depression of serum growth hormone during maternal deprivation in rat pups. **Science** 201:1034-1036. 1978.
- KUHN, C.M., EVONIUK, G., SCHANBERG, S.M. Loss of tissue sensitivity to growth hormone during maternal deprivation in rats. **Life Sciences** 25: 2089-2097. 1979.
- LAU, C., HENNING, S.J. Regulation of milk ingestion in the infant rat. **Physiology & Behavior** 33:809-815. 1984.

- LAUDENSLAGER, M.L., HELD, P.E., BOCCIA, M.L., REITE, M.L., COHEN, J.J. Behavioral and immunological consequences of brief mother-infant separation: a species comparison. **Developmental Psychobiology** 23 (3):247-264. 1990.
- LEHMANN, J., PRYCE, C.R., BETTSCHEN, D., FELDON, J. The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female wistar rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 64(4):705-715. 1999.
- LEON, M. Maternal pheromone. **Physiology & Behavior** 13:441-453. 1974.
- LEON, M., CROSKERRY, P.G., SMITH, G.K. Thermal control of mother-young contact in rats. **Physiology & Behavior** 21:793-811. 1978.
- LEON, M., MOLTZ, H. Maternal Pheromone: discrimination by pre-weanling albino rats. **Physiology & Behavior** 7:265-267. 1971.
- LEON, M, ADELS, L., COOPERSMITH, R, WOODSIDE, B. Diurnal cycle of mother-young contact in norway rats. **Physiology & Behavior** 32:999-1003. 1984.
- LEVINE, S. The ontogeny of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Annals New York Academy of Sciences** 746: 275-288. 1994.
- LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiology & Behavior** 73:255-260. 2001
- LEVINE, S., HALTMEYER, G.C, KARAS, G., DENENBERG, V.H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. **Physiology & Behavior** 2: 55-59.1967.
- LIU, D., DIORIO, J., DAY, J.C., FRANCIS, D., MEANEY, M.J. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nature Neuroscience** 3 (8):799-806. 2000.
- LIU, D., DIORIO, J., TANNENBAUM, B., CALDJI, C., FRANCIS, D., FREEDMAN, A., SHARMA, S., PEARSON, D., PLOTSKY, P.M., MEANEY, M.J.1998. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science** 277: 1659-1662. 1997.

- LONSTEIN, J.S., WAGNER, C.K., DE VRIES, G.J. Comparison of the nursing and other parental behaviors of nulliparous and lactating female rats. **Hormones and Behavior** 36:242-251. 1999.
- MEANEY, M.J., BHATNAGAR, S., LAROCQUE, S., MCCORMICK, C., SHANKS, N., SHARMA, S., SMYTHE, J., VIAU, V., PLOTSKY, P.M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. **Annals New York Academy of Sciences** 697:70-85. 1993.
- MEANEY, M.J., BRAKE, W. GRATTON, A . Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: a neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? **Psychoneuroendocrinology** 27(1-2):127-138.2002.
- MOORE, C.L. Sex differences in urinary odors produced by young laboratory rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology** 99(3): 336-341. 1985.
- MOORE, C.L. The role of maternal stimulation in the development of sexual behavior and its neural basis. **Annals New York Academy of Sciences**, 662:160-177. 1992.
- MOORE, C.L., MORELLI, G.A. mother rats interact differently with male and female offspring. **Journal of Comparative and Physiological Psychology** 93(4):677-684. 1979.
- MOORE, C.L., POWER, K.L. Variations in maternal care and individual differences in play, exploration, and grooming of juvenile norway rat offspring. **Developmental Psychobiology** 25(3):165-182. 1992.
- NELSON, R.J. Parental behavior. Em: An introduction to behavioral endocrinology. Sinauer Associates, Inc. 1995.
- NUMAN, M. Maternal behavior. Em: The physiology of reproduction. Ed. Knobil, E. & Neill, J. Raven Press, Ltd., New York. 1988.
- OGAWA, T., MIKUNI, M., KURODA, Y., MUNEOKA, K., MORI, K.J., TAKAHASHI, K. P. Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress- induced

- adrenocortical response and reduces the frequencies of open field- induced behaviors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 49(4): 961-967. 1994.
- PADOIN, M.J., CADORE, L.P., GOMES, C.M., BARROS, H.M., LUCION, AB. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. **Behavioral Neuroscience** 115:1332-1340. 2001.
- PADOIN, M.J., DE JORGI, M., PEREIRA F.M., SIMON, S.P., LUCION, A. B. Efeito da estimulação neonatal sobre a apoptose neuronal na amígdala medial em ratos com 5 dias de idade. Resumo apresentado na XV Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2000.
- PLOTSKY, P.M., MEANEY, M.J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF contents and stress- induced release in adult rats. **Molecular Brain Research**, 18:195-200. 1993.
- POLAN, H.J., HOFER, M.A. Maternal directed orienting behaviors of newborn rats. **Developmental Psychobiology** 34:269-279. 1999.
- REISBICK, S., ROSENBLATT, J.S., MAYER, A.D. Decline of maternal behavior in the virgin and lactating rat. **Journal of Comparative Physiological Psychology**, 89: 722-732. 1975.
- RHEES, R.W., LEPHART, E.D., ELIASON, D. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproduction function. **Behavioral Brain Research** 123: 1-10. 2001.
- ROSENFELD, P., WETMORE, J.B., LEVINE, S. Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of preweanling rats. **Physiology & Behavior** 52:787-791. 1992.
- SAPOLSKY, R.M., KREY, L.C., MCEWEN, B.S. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. **Journal of Neuroscience** 5:1222-1227.1985.
- SCOTT, J.P. Critical periods in behavioral development. **Science** 138: 949-958. 1962.
- SCHANBERG, S.M., KUHN, C.M. The biochemical effects of tactile deprivation in neonatal rats. **Perspectives on Behavioral Medicine**, 2:133-148. 1995.

- SCHANBERG, S.M., EVONIK, G., KUHN, C.M. Tactile and nutritional aspects of maternal care: specific regulators of neuroendocrine function and cellular development. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** 175:135-146. 1984.
- SCHELSTRAETE, I., KNAEPEN, E., DUTILLEUL, P., WEYERS, M.H. Maternal behavior in the wistar rat under atypical zeitgeber. **Physiology & Behavior** 52:189-193. 1992.
- SIECK, G., RAMALEY, J.A. Effects on early handling upon puberty: correlations with adrenal stress responsiveness. **Physiology & Behavior** 15: 487-489. 1975
- STERN, J.M., JOHNSON, S.K. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. **Physiology & Behavior**, 47:993-1011. 1990.
- SUCHECKI, D., MOZAFFARIAN, D., GRASS, G., ROSENFELD, P., LEVINE, S. Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. **Neuroendocrinology** 57:204-212. 1993.
- SWANSON, H.H., BOLWERK, E., BRENNER, E. Effects of cooling in infant rats on growth, maturation, sleep patterns and responses to food deprivation. **British Journal of Nutrition**, 52: 139-148. 1984.
- VAN OERS, H.J.J., DE KLOET, E.R., WHELAN, T., LEVINE, S. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. **The Journal of Neuroscience** 18(23): 10171-10179. 1998.
- VILLESCAS, R., BELL, R.W., WRIGHT, L., KUFNER, M. Effect of handling on maternal behavior following return of pups to the nest. **Developmental Psychobiology** 10 (4): 323-329. 1977.
- WALKER, C.D., SAPOLSKY, R.M., MEANEY, M.J., VALE, W.W., RIVIER, C.L. Increased pituitary sensitivity to glucocorticoid feedback during the stress nonresponsive period in the neonatal rat. **Endocrinology** 119:1816-1821. 1986.
- WALKER, C.D., SCRIBNER, K.A., CASCIO, C.S., DALLMAN, M.F. The pituitary-adrenocortical system of neonatal rats is responsive to stress throughout

development in a time-dependent and stressor-specific fashion. **Endocrinology** 128: 1385-1395. 1991.

WIGGER, A., NEUMANN, I.D. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. **Physiology & Behavior** 66: 293-302. 1999.

WINKELMANN, E.C., PEREIRA, F.M., SANVITTO, G.L., ANSELMO-FRANCI, J., LUCION, A. B. Estimulação neonatal, número e tamanho de neurônios do *Locus coeruleus* em ratas. Resumo apresentado na XV Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2000.

ZARROW, M.X., HALTMEYER, G.C., DENENBERG, V.H., THATCHER, J. Response of the infantile rat to stress. **Endocrinology**, 79: 631-634. 1966.



**Figura 2.** Procedimento de manipulação por 1 minuto. A mãe encontra-se na caixa ao lado. Este procedimento foi aplicado durante os primeiros 10 dias pós-parto nos filhotes do grupo manipulado.





**Figura 3.** Sala de filmagem.



**Figura 4.** Mãe amamentando os filhotes com a postura de dorso arqueado.



**Figura 5.** Mãe junto aos filhotes no ninho, sem apresentar a postura de amamentação com o dorso arqueado.