

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

HELOÍSA HELENA VILELA COSTA

**INFLUÊNCIA DA INFUSÃO CONTÍNUA E
CENTRAL DE AGONISTA CB1 SOBRE O
COMPORTAMENTO MATERNO DE RATAS
LACTANTES E CONSEQUÊNCIAS
COMPORTAMENTAIS NOS DESCENDENTES**

ALFENAS/MG

2013

HELOÍSA HELENA VILELA COSTA

**INFLUÊNCIA DA INFUSÃO CONTINUA E
CENTRAL DE AGONISTA CB1 SOBRE O
COMPORTAMENTO MATERNO DE RATAS
LACTANTES E CONSEQUÊNCIAS
COMPORTAMENTAIS NOS DESCENDENTES**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: neuroendocrinologia. Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva.

ALFENAS/MG

2013

HELOÍSA HELENA VILELA COSTA

**INFLUÊNCIA DA INFUSÃO CONTINUA E
CENTRAL DE AGONISTA CB1 SOBRE O
COMPORTAMENTO MATERNO DE RATAS
LACTANTES E CONSEQUÊNCIAS
COMPORTAMENTAIS NOS DESCENDENTES**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em:

Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva

Assinatura:

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Luciano Freitas Felicio

Assinatura:

Instituição: Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Junior

Assinatura:

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Dedico este trabalho à pessoa mais importante da minha vida: minha mãe, Vera. Obrigada pela amizade, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida, serei eternamente grata. Amo você.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional e pessoal, em especial:

Aos meus pais, Vera e Marcelo, meus irmãos e minha avó pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu namorado Murilo pelo carinho, ajuda e companheirismo tanto nos momentos bons como nos ruins e por compreender minha ausência.

Ao orientador Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva e à Fabiana pela confiança, paciência e grande contribuição para o meu crescimento profissional.

Às minha amigas Lidiane e Fernanda pela amizade, risadas e grande apoio durante esse período.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas, pela possibilidade de execução deste trabalho.

A todos os professores que passaram por minha vida, pela contribuição na minha formação acadêmica.

Aos colegas de pós-graduação, pelo incentivo e por terem compartilhado comigo tantas expectativas, angústias e conhecimentos.

Aos velhos amigos, por compreenderem os momentos de ausência e aos novos amigos conquistados na caminhada científica.

Aos funcionários Marina, José, Antonieta e João pela ajuda e momentos de descontração.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido.

E por fim, mas não menos importante, aos animais que tanto contribuíram para a realização deste estudo oferecendo sua vida.

RESUMO

Tem sido demonstrado que a administração sistêmica de canabinóides em ratas lactantes prejudica o comportamento materno. Portanto, objetivou-se determinar quais são, especificamente, as alterações provocadas neste cuidado materno mediante infusão crônica central de agonista do receptor CB1 (WIN 55,212-2) nas doses de 10 e 100nmol. As análises do comportamento materno foram realizadas em 4 sessões diárias (3 durante a fase clara e 1 durante a fase escura) de 72 minutos cada, sendo registradas de 3 em 3 minutos totalizando 25 observações por sessão (portanto, 100 observações diárias). O resultado das análises, durante a infusão da droga, indicou diminuição do tempo de lambida e consequente aumento no tempo que as ratas passam alimentando-se. Mesmo após o período de infusão da droga (7 dias), o comportamento materno total permaneceu diminuído. Como interferências sofridas durante o período neonatal que provoquem variações no cuidado materno podem persistir e influenciar o fenótipo dos filhotes, foram verificadas possíveis alterações comportamentais em respostas de ansiedade e medo na prole quando em idade adulta. Para tanto, os filhotes machos e fêmeas (quando completaram 8 semanas de vida), foram submetidos aos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado e medo condicionado ao contexto. Os resultados encontrados mostram que os filhotes machos apresentam menor latência para exibição do primeiro *freezing* no teste de medo. Por outro lado, as fêmeas apresentaram somente elevação da pressão arterial quando submetidas ao mesmo teste. Em conjunto, os resultados sugerem que canabinóides diminuem o cuidado materno em ratas lactantes, principalmente a lambida, e mesmo após a suspensão da infusão da droga, a redução do comportamento materno total permanece. Essa diminuição do cuidado materno refletiu principalmente nos filhotes machos, aumentando respostas relacionadas ao medo.

Palavras-chave: Comportamento materno. Lactação. Canabinóide. Receptor CB1. Filhotes.

ABSTRACT

It has been demonstrated that systemic administration of cannabinoids in lactating rodents affect maternal behavior. Therefore, the objective was to determine what changes, specifically, in maternal care caused by chronic infusion of central CB1 receptor agonist (WIN 55,212-2) at doses of 10 and 100nmol. Analyses of maternal behavior were performed in 4 sessions daily (3 during the light phase and 1 during the dark phase) of 72 minutes each, being recorded from 3 in 3 minutes totaling 25 observations per session (so 100 daily observations) . The result of the analysis, during infusion of the drug, indicated decreased time to licking and consequent increase in the time that the rat is feeding. Even after the period of drug infusion (7 days), the total maternal behavior remained decreased. How interference occurred during the neonatal period that cause variations in maternal care may persist and influence the phenotype of the offspring, were evaluated possible changes in anxiety and fear responses in the offspring when in adulthood. Therefore, males and females puppies (when completed 8 weeks of life), were tested in the open-field, elevated plus maze and fear conditioning to context. The results show that male offspring have lower latency to display the first freezing in this fear test. Moreover, the females showed only elevated blood pressure when subjected to the same test. Together, the results suggest that cannabinoids decrease maternal care in lactating rats, mainly licking, and even after cessation of drug infusion, the reduction of total maternal behavior remains. This decrease in maternal care reflected mainly in male offspring, increasing responses related to fear.

Keywords: Maternal behavior. Lactation. Cannabinoid. CB1 receptor. Offspring.

LISTA DE FIGURAS

- | | |
|--|----|
| Figura 1 - Circuitos neurais que regulam alguns aspectos relacionados ao comportamento materno. | 22 |
| Figura 2 - Modelo do sistema de injeção utilizado. | 29 |

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	- Comportamento materno de ratas ao longo da lactação.	36
Gráfico 2	- Comportamento não-materno de ratas ao longo da lactação.	37
Gráfico 3	- Efeito da infusão crônica de WIN (10 e 100nmol) no comportamento materno de ratas ao longo da lactação.	39
Gráfico 4	- Efeito da infusão crônica de WIN (10 e 100nmol) no comportamento não-materno de ratas ao longo da lactação.	40
Gráfico 5	- Avaliação do comportamento materno durante a infusão de WIN nas doses de 10 e 100nmol.	42
Gráfico 6	- Avaliação do comportamento não-materno durante a infusão de WIN nas doses de 10 e 100nmol.	43
Gráfico 7	- Avaliação do comportamento materno após suspensão da infusão de WIN.	44
Gráfico 8	- Avaliação do comportamento materno após suspensão da infusão de WIN.	45
Gráfico 9	- Avaliação do ganho de peso da ninhada por intervalos diários.	46
Gráfico 10	- Efeito da infusão crônica de WIN (10 e 100nmol) no ganho de peso da ninhada (A) e da mãe (B).	47
Gráfico 11	- Labirinto em cruz elevado de filhotes machos de mães tratadas com veículo (controle) ou WIN nas doses de 10 e 100nmol.	48
Gráfico 12	- Campo aberto de filhotes adultos machos de mães tratadas com veículo (controle) ou WIN nas doses de 10 e 100nmol	50
Gráfico 13	- Teste de medo condicionado ao contexto de descendentes machos em idade adulta de mães tratadas com veículo e WIN nas doses de 10 e 100nmol.	52
Gráfico 14	- Variação da média da pressão arterial (Δ MPA) e da frequência cardíaca (Δ FC) de descendentes condicionados (A e C, respectivamente) ou não (B e D, respectivamente) ao choque.	53
Gráfico 15	- Labirinto em cruz elevado de filhotes fêmeas de mães tratadas com veículo (controle) ou WIN nas doses de 10 e 100nmol.	55

- Gráfico 16** - Campo aberto de filhotes adultos fêmeas de mães tratadas com veículo (controle) ou WIN nas doses de 10 e 100nmol. 57
- Gráfico 17** - Teste de medo condicionado ao contexto de descendentes fêmeas em idade adulta de mães tratadas com veículo e WIN nas doses de 10 e 100nmol. 59
- Gráfico 18** - Variação da média da pressão arterial (Δ MPA) e da frequência cardíaca (Δ FC) de descendentes condicionados (A e C, respectivamente) ou não (B e D, respectivamente) ao choque. 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔFC	- Variação da frequência cardíaca
ΔMPA	- Variação da média da pressão arterial
ACTH	- Hormônio adrenocorticotrópico
AHN	- núcleo hipotalâmico anterior
AIDS	- Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANOVA	- Análise de variância
AP	- Ântero-posterior
BLA	- Amígdala basolateral
BMA	- Amígdala basomedial
BNST	- <i>Bed</i> núcleo da estria terminal
CM	- comportamento materno
CMT	- Comportamento materno total
CnMT	- Comportamento não-materno total
CRF	- Fator liberador de corticotropina
DA	- Dopamina
DL	- Dia de lactação
DMSO	- Dimetil sulfóxido
EC	- Endocanabinóide
EPM	- Erro padrão da média
FC	- Frequência cardíaca
GABA	- Ácido gama-amino-butírico
HHA	- Hipotálamo-hipófise-adrenal
HL	- <i>high licking</i>
i.c.v.	- Intracerebroventricular
i.p.	- intraperitoneal
L	- Lateral
LL	- <i>lowlicking</i>
MeA	- Amígdala medial
mPOA	- Área pré-óptica medial
NA	- Núcleo accumbens
OT	- Ocitocina

PA	- Pressão arterial
PAG	- Substância cinzenta periaquedutal
PE	- Polietileno
PFC	- córtex pré-frontal
SNC	- Sistema nervoso central
THC	- Δ 9-tetrahydrocannabinol
V	- Vertical
VMN	- núcleo hipotalâmico ventral
VP	- Pallidum ventral
VTA	- Área tegmental ventral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Cuidado materno	14
1.2	Interferência do cuidado materno na prole adulta	18
1.3	Influência dos endocanabinóides	21
1.4	Mecanismos neurais relacionados ao comportamento materno	24
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo geral	27
2.2	Objetivos específicos	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Animais	28
3.2	Acasalamento	28
3.3	Cirurgia estereotáxica e implante dos <i>minipumps</i> osmóticos	29
3.4	Avaliação do comportamento materno	30
3.5	Avaliação do ganho de peso da ninhada e da mãe	30
3.6	Avaliação comportamental dos filhotes na fase adulta	31
3.6.1	<i>Labirinto em cruz elevado</i>	31
3.6.2	<i>Campo aberto</i>	31
3.6.3	<i>Medo condicionado ao contexto</i>	32
3.6.3.1	<i>Freezing</i>	33
3.6.3.2	Registro de parâmetros cardíacos	33
3.7	Análise estatística	34
4	RESULTADOS	35
4.1	Avaliação do comportamento materno	35
4.2	Avaliação do ganho de peso da ninhada e da mãe	46
4.3	Avaliação comportamental dos filhotes machos em idade adulta	47
4.3.1	<i>Labirinto em cruz elevado</i>	47
4.3.2	<i>Campo aberto</i>	49
4.3.3	<i>Medo condicionado ao contexto</i>	51
4.3.3.1	<i>Freezing</i>	51
4.3.3.2	Parâmetros cardíacos	52

4.4	Avaliação comportamental dos filhotes fêmeas em idade adulta	54
4.4.1	<i>Labirinto em cruz elevado</i>	54
4.4.2	<i>Campo aberto</i>	56
4.4.3	<i>Medo condicionado ao contexto</i>	58
4.4.3.1	<i>Freezing</i>	58
4.4.3.2	Parâmetros cardíacos	59
5	DISCUSSÃO	61
5.1	Efeito da infusão contínua de WIN55,212-2 no comportamento materno exibido por ratas durante a lactação	61
5.2	Consequências da diminuição do comportamento materno em ratas lactantes com relação à avaliação comportamental dos filhotes na vida adulta	65
6	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO

Em ratas lactantes, o cuidado maternal é constituído por vários elementos integrados dirigidos à promoção de cuidado e nutrição da prole para garantir sua sobrevivência. Variações nesse cuidado materno recebido durante o período neonatal podem afetar o fenótipo dos filhotes quando atingem a idade adulta (MOORE, 1984, 1992; LIU et al., 1997).

Diante disso, torna-se importante a investigação dos mecanismos envolvidos nas diferenças no padrão de comportamento materno exibido por ratas lactantes. É descrito que algumas substâncias, como os canabinóides, podem provocar prejuízos no desempenho da mãe em cuidar dos filhotes (MANDUCA; CAMPOLONGO; TREZZA, 2012). Assim, surgiu o interesse na investigação dos efeitos no cuidado maternal frente infusão central contínua de um agonista canabinóide (WIN 55,212-2) e suas conseqüências na prole quando atinge a idade adulta.

1.1 Cuidado materno

O conjunto de cuidados que a mãe oferece aos filhotes é denominado comportamento materno (CM) (NUMAN, 1994). Trata-se de um comportamento espontâneo, instintivo e específico de cada espécie, sendo determinado por modificações fisiológicas que ocorrem imediatamente antes e após o parto (NUMAN, 1994). Durante esse período, a meta da fêmea é garantir a sobrevivência própria e de seus filhotes (MIRANDA-PAIVA et al., 2003).

Logo após o parto, nos primeiros dias de vida, a rata lactante age instintiva e espontaneamente, visando manter uma série de comportamentos relacionados aos filhotes, podendo passar até 80% do tempo junto da prole (GROTA; ADER, 1969, 1974; STERN, 1997). À medida que os filhotes crescem e tornam-se mais independentes, já sendo capazes de se alimentarem e auto-regular termicamente, a mãe torna-se menos responsiva, podendo despender apenas 25% do seu tempo com a prole (NUMAN, 1994).

Esse empenho em cuidar dos filhotes pode ser vinculado à motivação. Motivação pode ser definida como um processo interno que modifica a maneira de resposta do organismo frente a estímulos externos (NUMAN; WOODSIDE, 2010; PFAFF, 1982). No que diz respeito ao comportamento maternal na maioria dos mamíferos, tal definição é apropriada já que para o início da ação do cuidado é necessário que ocorram mudanças de fatores internos para que haja uma responsividade diferente ao estímulo externo, no caso, o neonato. Sabe-se que o início do comportamento materno em ratas é sincronizado com o nascimento dos filhotes, pois algumas mudanças que ocorrem no organismo da mãe despertam ações relacionadas; essas alterações também possuem papel importante na manutenção do cuidado no período pós-parto. (WEISNER; SHEARD, 1933).

Algumas dessas alterações ocorrem até mesmo antes do parto e objetivam a preparação para os cuidados da ninhada. No tocante comportamental, as mudanças estão relacionadas com os padrões de limpeza corporal exibidos pela mãe, a qual leva mais tempo na limpeza da região mamária a fim de auxiliar no desenvolvimento das glândulas e a hiperfagia, além de iniciar a construção do ninho para promover a termoregulação dos filhotes (NUMAN, 1994).

Além disso, alterações hormonais que ocorrem durante e no final da gestação são responsáveis por modificar funções cerebrais da mãe que controlam ações relacionadas ao cuidado materno. O perfil hormonal da parturiente é caracterizado pela elevação nos níveis de estrógeno, prolactina e ocitocina e declínio da progesterona. Diante de tais modificações prévias, a resposta ao estímulo dos filhotes é imediata nas ratas primíparas (NUMAN, 2006).

Por outro lado, é possível observar comportamentos relacionados ao filhote exibidos por ratas virgens, as quais não expressam as alterações prévias observadas em gestantes (SHEEHAN et al., 2000; FRANCIS et al., 1999; CHAMPAGNE et al., 2001). Por isso, os comportamentos não surgem imediatamente após o parto como em lactantes, é necessário que a rata nulípara entre em contato com a ninhada por uma semana ou mais – processo denominado sensibilização (ROSENBLATT, 1967). Normalmente, ratas virgens podem evitar ou até atacar filhotes que forem apresentados a elas (ROSENBLATT; MAYER, 1995). Contudo, a aversão aos filhotes diminui durante esse período de sensibilização, pois o odor dos filhotes deixa de ser aversivo e a partir de então, as ratas passam a

cuidar da ninhada, mesmo impossibilitadas de amamentar (FLEMING; LUEBKE, 1981).

Nota-se, portanto, que a expressão do comportamento materno não é regulada somente por fatores hormonais (LONSTEIN; WAGNER; VRIES, 1999). O contato com os filhotes também é responsável por atrair a atenção da mãe através de algumas ações exibidas por eles, como vocalizações e movimentos do corpo (POLAN; HOFER, 1999) e por estímulos olfatórios (MOORE, 1985; JANS; LEON, 1983). Tais fatores permitem a promoção do aumento ou até mesmo surgimento do comportamento materno.

Contudo, as mães não são somente motivadas a cuidar diretamente dos filhotes, elas sofrem mudanças tanto comportamentais como fisiológicas e motivacionais, tendo o sucesso no cuidado da prole como objetivo (NUMAN; WOODSIDE, 2010). Dentre elas há alterações do padrão alimentar, ingerindo maior quantidade de alimento comparada com o período de gestação (WOODSIDE, 2007), diminuição do medo (LONSTEIN; SIMMONS; STERN, 1998) e da responsividade ao estresse (SLATTERY; NEUMANN, 2008), além das importantes alterações nos níveis de ansiedade e agressividade.

Logo, em ratas lactantes, o cuidado maternal está constituído por vários elementos integrados dirigidos à promoção de cuidado e nutrição da prole para garantir sua sobrevivência. Dentre as ações maternas, são observadas e classificadas como condutas não interativas a ansiólise e agressão maternal contra um intruso (FERREIRA et al., 2002; HUNTINGFORD, 1989).

A agressão maternal consiste em comportamentos específicos executados pela mãe em relação a um intruso, com ou sem a intenção de lesá-lo. (HUNTINGFORD, 1989). A agressão maternal surge durante a gravidez, quando os filhotes ainda não estão fisicamente presentes para prover estímulos sensoriais, nesse período a influência pode ser hormonal (MAYER; ROSENBLATT, 1987).

Paralelamente, ratas lactantes apresentam ansiedade diminuída nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado quando comparadas com ratas não lactantes. Essa resposta reduzida à ansiedade durante a lactação pode ser denominada ansiólise maternal, a qual se sugere estar envolvida com os elevados níveis de ocitocina e prolactina. (FERREIRA et al., 2002; NUMAN, 1994; FLEMING; WALSH, 1994). Portanto, pode-se considerar que a agressividade e a ansiólise maternal fazem parte do repertório comportamental de ratas lactantes.

Além disso, existem comportamentos diretamente relacionados aos filhotes como construção do ninho, lambida ano-genital e posicionamento sobre eles para provê-los de nutrição e calor (MANN, 2006). Dos diversos parâmetros maternos exibidos por roedores, os mais comumente avaliados, por se correlacionarem com a “qualidade” do cuidado, são a cifose e tempo de lambida (BOSCH; NEUMANN, 2011).

A fim de amamentar os filhotes, as ratas lactantes exibem posturas corporais distintas. Elas podem deitar-se de lado (posição passiva), sobre os filhotes ou permanecerem sobre os filhotes em posição arqueada, denominada cifose (CALDJI et al., 1998; PEDERSEN; BOCCIA, 2003; PEDERSEN; PRANGE, 1979; STERN; JOHNSON, 1990) . A cifose, postura mais comumente exibida, é considerada um posicionamento de cuidado ativo e pode ser indicativo da qualidade do cuidado materno em linhagens cuja lambida não é tão evidenciada (GUBERNICK; ALBERTS, 1983; BOSCH; NEUMANN, 2011).

Outro parâmetro comportamental importante é a lambida, a qual envolve principalmente a região ano-genital do filhote, sendo esse ato benéfico tanto para a mãe quanto para a prole. A lambida favorece a reposição de água e eletrólitos pela mãe, já que ela ingere parte da urina dos filhotes (GUBERNICK; ALBERTS, 1985). Por outro lado, tal comportamento também objetiva limpar a cria, estimular a defecação e micção dos filhotes (GUBERNICK; ALBERTS, 1983), além de exibir alto impacto no desenvolvimento social e emocional dos filhotes (CALDJI et al., 1998; CHAMPAGNE, 2008).

A frequência de lambida tem sido usada como um padrão para mensuração do cuidado materno (LIU et al., 1997; CALDJI et al., 1998; CHAMPAGNE; FRANCIS; MEANEY, 2003; HANCOCK; MENARD; OLMSTED, 2005; VEENEMA; NEUMANN, 2009; PARENT; MEANEY, 2008; LENZ; SENGELAUB, 2009). Apesar de haver variações individuais dentro de uma população (CHAMPAGNE et al., 2003), verificou-se uma distribuição normal quando avaliado um grande número de ratas lactantes (CHAMPAGNE; FRANCIS; MEANEY, 2003). Contudo, estudos classificaram as mães segundo a frequência de lambe os filhotes: “muito lambedoras” (*high licking mothers* - HL) e “pouco lambedoras” (*low licking mothers* - LL), grupos que representam os extremos de uma mesma população (CHAMPAGNE, 2008; LIU et al., 1997; CALDJI et al., 1998).

Dessa forma, sabe-se que essa interação entre mãe e filhote é essencial para a sobrevivência da prole. Além disso, tem sido demonstrado que adversidades sofridas precocemente pelos filhotes, inclusive variações na lambida, podem ter futuras consequências neuroendócrinas, alteração da função cognitiva e aumento da vulnerabilidade para o desenvolvimento de psicopatologias (BREIER et al., 1988; AGID et al., 1999; PECHTEL; PIZZAGALLI, 2011).

1.2 Interferência do cuidado materno na prole adulta

Os filhotes de ratas demandam grande cuidado, pois nascem desprovidos de pêlos, surdos, cegos e incapazes de se locomoverem e regularem sua temperatura corporal (GROTA; ADER, 1969; GUBERNICK; KLOPFER, 1981). Por isso, em roedores, o CM pode ser observado com mais intensidade durante as duas primeiras semanas após o parto, declinando posteriormente até que os filhotes cresçam e tornem-se independentes (NUMAN, 1994); assim, a primeira semana de vida pós-natal em roedores consiste em um período crítico de sensibilidade (LABAN et al., 1995; ROTS et al., 1996).

Tem sido demonstrado que interferências, sofridas durante o período neonatal de sensibilidade, que provoquem variações no cuidado materno, podem persistir e influenciar o fenótipo dos filhotes (MOORE, 1984, 1992; LIU et al., 1997). Independente da origem dessas variações no comportamento materno - seja naturalmente pelas diferenças nas populações ou por manipulação e administração de drogas – os efeitos muitas vezes são refletidos nos filhotes quando atingem a fase adulta. Assim, o cuidado maternal tem um importante papel no desenvolvimento cognitivo e emocional da prole (KAFFMAN; MEANEY, 2007).

Em humanos, por exemplo, quando há enfrentamento de adversidades no início do desenvolvimento infantil, há um risco aumentado de desenvolvimento de doenças físicas e distúrbios psiquiátricos na vida adulta (GOODWIN; STEIN, 2004). Todavia, as bases moleculares e circuitaria neural envolvida em humanos ainda não está clara, assim estudos com roedores podem fornecer um melhor entendimento no tocante da relação entre mãe e filhotes (MANDUCA; CAMPOLONGO; TREZZA, 2012).

Alterações no cuidado maternal em roedores podem influenciar as respostas neuroendócrinas e comportamentais – relacionadas à ansiedade, medo e estresse, por exemplo - dos filhotes na fase adulta. (CIRULLI; BERRY; ALLEVA, 2003; LEVINE, 2000; PRYCE et al., 2001; URIARTE et al., 2007). Em laboratório, dentre as possíveis experiências precoces pelas quais os filhotes são expostos estão manipulação neonatal (*handling*), privação maternal, alterações fisiológicas na mãe, além de variações naturais no cuidado que permitiu a classificação das mães como *high* ou *low licking* (URIARTE et al., 2007).

Após a manipulação neonatal (*handling*), há aumento do cuidado materno, especificamente elevação da frequência de lambida (LEE; WILLIAMS, 1974; LIU et al., 1997). Essa experiência precoce afeta os filhotes quando em idade adulta, havendo diminuição do medo e hiporesponsividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) sob condições de estresse (MEANEY et al., 1988; VALLÉE et al., 1997; ABORELIUS; ENKLUND, 2007; CALDJI et al., 2000; LEVINE, 1962; LEVINE et al., 1967; MEERLO et al., 1999; PADOIN et al., 2001; SEVERINO et al., 2004), assim como redução do comportamento sexual e funções reprodutivas (GOMES et al., 2005; PADOIN et al., 2001; RAINEKI et al., 2008). Além disso, há redução da interação social e elevação no comportamento agressivo (LIM; YOUNG, 2006; LEE et al., 2007).

Por outro lado, a separação maternal prolongada induz prejuízo do comportamento materno, incluindo redução na lambida (LIU et al., 1997). Conseqüentemente, a prole quando adulta mostra aumento de respostas neuroendócrinas ao estresse, incluindo elevação nos níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona (LIU et al., 1997; CIRULLI; BERRY; ALLEVA, 2003;). Além disso, esses animais também exibem um aumento na resposta acústica de sobressalto e elevação nos comportamentos relacionados à ansiedade e medo quando expostos a um ambiente novo (LIU et al., 1997).

Algumas interferências fisiológicas realizadas nas mães também afetam o desenvolvimento da prole. A inibição farmacológica da prolactina materna, por exemplo, reflete nos filhotes prejudicando o aprendizado, a memória e aumentando a ansiedade no teste de labirinto em cruz elevado, no qual há redução no número de entradas no braço aberto (FRAGA et al., 2011). Outro exemplo consiste na indução de hiperleptinemia materna durante a lactação, a qual gerou nos filhotes adultos

consequências relacionadas à ansiedade e memória, exibindo diminuição e aumento, respectivamente (FRAGA-MARQUES et al., 2009).

Com relação à variação no cuidado materno naturalmente presente em uma população, animais nascidos e criados por mães classificadas como *high licking* (classificação dada às mães que lambem mais a prole) possuem diminuição na ansiedade quando comparados com filhotes de mãe *low licking*, pois apresentam aumento do comportamento exploratório no aparato de campo aberto, além de uma latência menor e um tempo maior de alimentação em um ambiente novo (CALDJI et al., 1998; URIARTE et al., 2007).

Em adição, outros estudos demonstram que filhotes de mães *high licking* são hiporresponsivos ao medo no *probe-burying test* quando comparados com aqueles de mães pouco lambedoras. Os primeiros quando submetidos ao estímulo aversivo de choque tiveram um aumento na expressão de c-Fos em diversas estruturas límbicas relacionada à redução do medo, o que corrobora com os testes comportamentais. Diante disso, tem sido proposto que o comportamento de lambida das mães nos filhotes modifique circuitos neurais associados à redução do medo, tornando-os hiporresponsivos a ambientes aversivos durante a fase adulta (MENARD; CHAMPAGNE; MEANEY, 2004).

As intervenções no ambiente neonatal induzem alterações na prole quando adulta, como exposto. Contudo, diversos estudos têm analisado também distintamente filhotes machos e fêmeas, como por exemplo, no que diz respeito a comportamentos emocionais. Os filhotes fêmeas que passaram pela manipulação no período neonatal apresentam maiores níveis de exploração no centro do campo aberto, quando comparadas com os machos que sofreram a mesma experiência precoce (PADOIN et al., 2001). Esses resultados estão de acordo com diversos estudos mostrando que fêmeas exibem menos comportamento relacionado ao medo e ansiedade que os machos (FERNANDES et al., 1999; JOHNSTON; FILE, 1991; STEENBERGEN et al., 1989). Ainda com relação à manipulação neonatal, fêmeas que passaram por tal interferência, foram menos afetadas que os machos nos testes de memória e interação social (KOSTEN; LEE; KIM, 2007; STAMATAKIS et al., 2008; AKERS; REEBA; TANG, 2004; CAMERON et al., 2008; PADOIN et al., 2001).

A variação natural do CM dentro de uma população também gera consequências distintas relacionadas ao gênero. As fêmeas de mães muito lambedoras apresentam significativa redução da intensidade de lordose e ovulação

quando comparadas com mães que lambem menos a prole (URIARTE et al., 2007; CAMERON et al., 2005; CHAMPAGNE et al., 2003). Em contraste, machos nascidos e criados por mães *high* e *low licking* não diferem no comportamento sexual (URIARTE et al., 2007).

Essa distinção é atribuída à diferença na experiência prévia relacionada aos cuidados recebidos pelos filhotes de acordo com o gênero. O comportamento materno de lambida ano-genital, por exemplo, é direcionado preferencialmente aos machos (MOORE; MORELLI, 1979; MOORE, 1992), o que pode explicar o dimorfismo sexual da prole em idade adulta (URIARTE et al., 2007). É possível que os filhotes machos sejam menos sensíveis às variações das frequências do comportamento de lambar, por naturalmente receberem altos níveis desse comportamento. Assim, pequenas variações no comportamento de lambar, poderiam não ter um efeito significativo (URIARTE et al., 2007).

Está bem consolidado, então, que interações mãe-filhotes são essenciais para o desenvolvimento neurocomportamental da prole, sendo que prejuízos nessa relação podem resultar em alterações neuroendócrinas, neuroquímicas e comportamentais durante a fase adulta (MANDUCA; CAMPOLONGO; TREZZA, 2012; MASHOODH et al., 2012). A complexa circuitaria neural que envolve essa interação entre mãe e filhotes vem sendo descrita em estudos detalhados, contudo ainda não está completamente elucidada (MANDUCA; CAMPOLONGO; TREZZA, 2012; CALDJI et al., 1998; NUMAN, 2006; NUMAN; FLEMING; LEVY, 2006; NUMAN, STOLZENBERG, 2009).

1.3 Mecanismos neurais relacionados ao comportamento materno

Algumas áreas cerebrais são importantes para o início e manutenção do CM e alguns mecanismos neurais são essenciais no controle de comportamentos motivados (NUMAN; WOODSIDE, 2010). A mPOA (área pré óptica medial), localizada no hipotálamo rostral, é uma região neural crítica envolvida na regulação do comportamento materno em ratos e outras espécies. (BRIDGES et al., 1990).

A circuitaria neural relacionada ao comportamento materno, incluindo estímulos e projeções da mPOA são ilustrados na Figura 1. O estímulo dos filhotes

pode ativar a mPOA, MeA (amígdala medial), BLA e BMA (amígdala basolateral e basomedial) e PFC (córtex pré frontal) o que provoca o comportamento de esquiva e outras reações defensivas. Em ratas lactantes, certos hormônios também podem ativar a mPOA e com isso essa região torna-se responsiva aos estímulos dos filhotes. Eferências da mPOA são responsáveis por deprimir respostas relacionadas à fuga no AHN e VMN (núcleo hipotalâmico anterior e ventral) e PAG (substância cinza periaquedutal). Além disso, eferências da mPOA são responsáveis por ativar os neurônios dopaminérgicos da VTA (área tegmental ventral) resultando na liberação de DA (dopamina) para NA (núcleo accumbens). Esta ativação do sistema mesolímbico dopaminérgico é capaz de alterar o circuito NA-VP (núcleo accumbens-pallidum ventral) de modo que este circuito se torne responsivo ao estímulo dos filhotes através da ativação do BLA e BMA, e PFC. A ativação do VP é essencial para as respostas maternas e a OT (ocitocina) age em vários locais diferentes para promover a responsividade materna adequada além de deprimir vias defensivas (NUMAN; WOODSIDE, 2010).

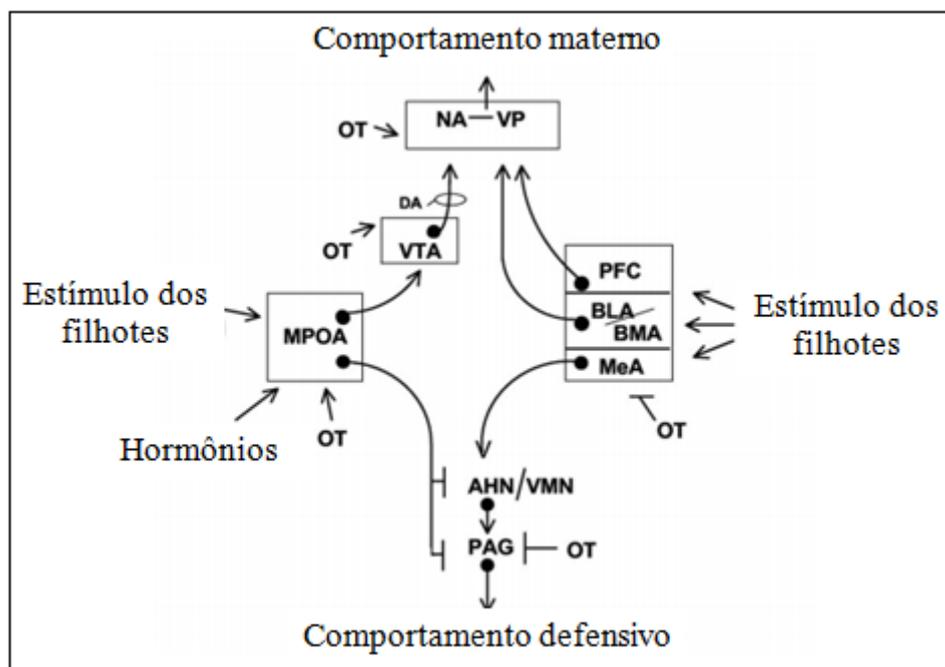


Figura 1 - Circuitos neurais que regulam alguns aspectos relacionados ao comportamento materno. Explicações para as abreviações constam no texto.
Fonte: NUNAM; WOODSIDE, 2010, modificado.

Há também evidência que a mPOA, juntamente com o BNST (*bed* núcleo da estria terminal) regulam componentes voluntários pró ativos do cuidado materno em

ratas (NUMAN et al., 2009). Lesões realizadas nessas duas áreas culminam no prejuízo do CM, principalmente aqueles relacionados à cavidade oral (NUMAN; NUMAN, 1997). A semelhança entre as áreas permanece com relação à alta densidade de receptores de neuropeptídeos e esteroides que estabelecem o CM em ratas (BAKOWSKA; MORREL, 1997; FREUND-MERCIER et al., 1987; PFAFF; KEINER, 1973), além de compartilhar das mesmas projeções eferentes com a mPOA (DONG; SWANSON, 2006a, 2006b; SIMERLY; SWANSON, 1988).

O BNST é crítico para o CM, porém pouco ainda se sabe sobre qual sistema neuroquímico dessa região influencia no cuidado (SMITH et al., 2012). Estudos mostram que o número de receptores para OT encontra-se aumentado em ratas durante a lactação (INSEL, 1986; 1990). Outro fator importante consiste na excitação neuronal do BNST e concomitante facilitação da ejeção de leite quando a OT é injetada i.c.v. (HOUSHAM; TEREZI; INGRAM, 1997); por outro lado, infusão de antagonista de ocitocina nessa região prejudica o comportamento materno (JACOBSON et al., 1980; NUMAN; SMITH, 1984; PEDERSEN et al., 1994; RUBIN; BRIDGES, 1984).

Portanto, a ocitocina demonstra importante papel ao longo do circuito. Ela é um hormônio liberado pela neurohipófise e também um neurotransmissor / neuromodulador, liberado em sinapses cerebrais (NUMAN, 1994). Seus receptores encontram-se amplamente difundidos em áreas relacionadas com o comportamento materno, além de aumentar sua expressão próxima ao tempo do parto em muitas dessas regiões (NUMAN; STOLZENBERG, 2009).

Contudo, verifica-se que a expressão do comportamento materno não é regulada direta e somente por fatores hormonais (LONSTEIN; WAGNER; VRIES, 1999). Estudos mostram que diversas substâncias administradas na mãe afetam o comportamento. Morfina, glicocorticóides e WIN 55,212-2 (agonista de receptor canabinoide CB1) são exemplos de substâncias que diminuem o CM quando administradas em lactantes (BRIDGES; GRIMM, 1982; RUBIN; BRIDGES, 1984; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2011; VILELA et al., 2013).

1.4 Influência dos canabinóides

Embora haja informações abundantes sobre a influência de diversos hormônios e neurotransmissores no comportamento materno em roedores, pouco ainda se sabe sobre a modulação pelo sistema endocanabinóide (MANDUCA; CAMPOLONGO; TREZZA, 2012). Antes mesmo da descoberta desse sistema, alguns efeitos biológicos de canabinóides exógenos, oriundos da planta *Cannabis sativa*, eram relatados (PAMPLONA; TAKAHASHI, 2012).

A *Cannabis sativa* (maconha) é uma das drogas psicoativas mais usadas, possuindo um consumo histórico documentado, datado de milhares de anos atrás (TOUWN, 1981; RUSSO, 2005; 2007; DI MARZO, 2006; DI MARZO; PETROCELLIS, 2006). Achados históricos e arqueológicos indicam o cultivo e uso da planta na China, desde o ano 4000 antes de Cristo. Os chineses já haviam até descrito propriedades medicinais dessa erva em sua farmacopeia, porém os primeiros relatos de uso terapêutico no ocidente são do início do século XIX. (PAMPLONA; TAKAHASHI, 2012; ZUARDI, 2006).

O componente psicoativo principal, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), uma molécula altamente lipofílica, foi identificado em 1964 (GAONI; MECHOULAM, 1964). Assim, os efeitos produzidos pelos compostos da *Cannabis* foram atribuídos à sua dispersão na membrana lipídica das células devido a esse acentuado caráter lipofílico (PATON, 1975). Entretanto, a desconfiança de que está hipótese era inválida surgiu diante do fato de que os principais efeitos do THC variavam de acordo com a dose administrada e diante de pequenas alterações na sua estrutura molecular (HOWLETT; FLEMING, 1984).

Estudos posteriores, então, levaram à identificação do sistema endocanabinóide endógeno que inclui: receptores canabinóides (CB1 e CB2), ligantes lipídicos endógenos – endocanabinóides (EC) como a anandamida e o 2-aracdonoil-glicerol – e enzimas envolvidas na síntese, transporte e degradação desses EC (DEVANE et al., 1992; FREUND et al., 2003; PIOMELLI, 2003; KOGAN; MECHOULAM, 2006).

O receptor canabinóide CB1, clonado em 1990 do cérebro de um mamífero (MATSUDA et al., 1990), é expresso quase ubiquamente em todo o cérebro (TSOU et al., 1998; MOLDRICH; WENGER, 2000) e exibe pouco padrão de expressão em

tecidos periféricos, tais como células imunes, tecido vascular e adipócitos (PAROLARO, 1999; HILLARD, 2000; COTA et al., 2003). Três anos após a descoberta do receptor CB1, o receptor denominado CB2 foi identificado e sua localização postulada engloba predominantemente o sistema imune periférico (MUNRO et al., 1993; BENITO et al., 2008).

As funções dos canabinóides estão diretamente relacionadas com a localização do receptor CB1 no sistema nervoso central, cuja distribuição é bem ampla: estriado e córtex cerebelar, hipocampo, amígdala, núcleo accumbens, área tegmental ventral, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, *bed* núcleo da estria terminal, bulbo olfatório, dentre outras (MOLDRICH; WENGER, 2000; TSOU et al., 1998; MASSI et al., 2008; GRUETER et al., 2006)

Sabe-se que os EC são sintetizados e liberados sob demanda em neurônios pós-sinápticos e agem como neurotransmissores retrógrados, ligando-se a receptores presentes em neurônios pré-sinápticos, através dos quais exercem seus efeitos inibitórios (BAYEWITCH et al., 1996; RHEE et al., 1997; STEFFENS et al., 2004). Sua função está relacionada com a modulação da liberação de neurotransmissores, incluindo o glutamato, GABA, acetilcolina, serotonina e norepinefrina (SCHLICKER; KATHMANN, 2001; WILSON; KUNOS; NICOLL, 2001; PIOMELLI, 2003).

De posse do conhecimento de tais funções básicas, tem sido estudado o papel do sistema endocanabinóide em diversos aspectos funcionais cerebrais (MANDUCA; CAMPOLONGO; TREZZA, 2012). A saber, influência no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e consequente regulação de respostas ao estresse (HILL et al., 2009; RIEBE; WOTJAK, 2011), modulação de estados emocionais (VIVEROS et al., 2007; MOREIRA; LUTZ, 2008; LUTZ, 2009; TABER; HURLEY, 2009; MARCO; LAVIOLA, 2012) e processo cognitivo (WOTJAK, 2005; RUBINO, PAROLO, 2008; CAMPOLONGO et al., 2009a; 2009b, 2012; AKIRAV, 2011; MARCO et al., 2011; TERZIAN et al., 2011; ZANETTINI et al., 2011; ATSAK et al., 2012) ao longo do tempo de vida.

Já os efeitos da *Cannabis* no comportamento materno são datados por volta do fim dos anos 1970 e início de 1980, quando o primeiro estudo reportado foi que a administração aguda e sub-crônica de THC suprimiu o comportamento de construção do ninho, em camundongos (MOSCHOVAKIS et al., 1978; SIEBER; FRISCHKNECHT; WASER., 1980). Efeitos similares têm sido reportados em ratas

lactantes, nas quais a injeção intravenosa de THC prejudicou todos os componentes do comportamento materno, inibindo inclusive a liberação de prolactina (BROMLEY et al., 1978). Contrariamente, o canabidiol, um componente não psicotrópico da planta *Cannabis sativa* (LEWEKE et al., 2012; ROCK et al., 2012), não apresentou efeito no comportamento materno (LAZARATOU et al., 1980).

O prejuízo no comportamento materno também foi observado após administração oral crônica, em camundongos, de um extrato de haxixe; embora nenhuma sedação geral tenha sido observada porque a tolerância a efeitos sedativos do haxixe desenvolveu-se muito rapidamente (FRISCHKNECHT; SIEBER; WASER, 1982). Estudos subsequentes confirmaram que a administração aguda de THC deprime o cuidado maternal (NAVARRO et al., 1995).

Mais recentemente, foi mostrado que camundongos tratados com antagonista do receptor CB1 - durante os primeiros oito dias após o parto – tendem a demorar mais tempo para levar todos os filhotes ao ninho e lambe menos a prole, quando comparado com o grupo de lactantes tratadas com veículo, o que sugere um prejuízo no cuidado materno (SCHECHTER et al., 2012).

Contudo, diante do escasso número de estudos e algumas contradições entre resultados obtidos, pesquisas mais bem controladas utilizando animais em laboratório poderia elucidar melhor o papel do sistema endocanabinóide no comportamento materno (MANDUCA; CAMPOLONGO; TREZZA, 2012).

Experimentos realizados em nosso laboratório demonstraram que a administração aguda de glicocorticoide provoca a supressão do comportamento materno (VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2011), mediado pelo sistema endocanabinóide atuando via receptor CB1 (VILELA et al., 2013). Diante disso surgiu o interesse na investigação dos efeitos no cuidado maternal frente infusão crônica intracerebroventricular de um agonista canabinóide (WIN 55,212-2), pois é conhecida a ampla distribuição dos receptores CB1 em regiões cerebrais relacionados a esse comportamento. Como o cuidado materno influencia diretamente o desenvolvimento da prole na fase adulta, alguns testes também foram realizados nestes filhotes.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem os seguintes objetivos.

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da infusão crônica intracerebroventricular de um agonista de receptor CB1 (WIN 55,212-2) sobre as respostas comportamentais de ratas lactantes e a influência dessas alterações nos filhotes durante a fase adulta.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência da infusão i.c.v. contínua (durante 7 dias) de WIN 55,212-2 (agonista de receptor CB1) sobre o comportamento materno de ratas lactantes através da análise diária por 21 dias;
- Avaliar a influência do tratamento sobre o ganho de peso da mãe e da ninhada;
- Verificar as alterações comportamentais relacionadas à ansiedade nos filhotes machos e fêmeas durante a fase adulta daquelas mães submetidas ao tratamento;
- Verificar as alterações comportamentais e autonômicas cardiovasculares relacionadas ao medo nos filhotes machos e fêmeas durante a fase adulta daquelas mães submetidas ao tratamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O material e metodologia utilizados para a realização deste trabalho são descritos.

3.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar com peso de 200 a 250g, a partir de 9 semanas de vida, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção, tratados com ração comercial e água “*ad libitum*” e mantidos em sala climatizada a 23 ± 2 °C em ciclo 12 horas claro-escuro – luzes acesas às 7:00hs.

Foram utilizados também machos (pesando de 270 a 300g) da mesma linhagem para o acasalamento, mantidos sob as mesmas condições.

3.2 Acasalamento

Ao final do dia, ratas que se encontravam no período de transição da fase proestro para o estro foram colocadas na caixa com um rato sexualmente experiente para o acasalamento - proporção de três fêmeas para um macho. Pela manhã do dia seguinte foi realizada a análise da citologia vaginal. O dia em cuja manhã foi constatada a presença de espermatozóides no lavado vaginal foi considerado o 1º dia de gestação. As ratas prenhas foram separadas individualmente em uma caixa transparente (29x44x17 cm) até o nascimento dos filhotes.

3.3 Cirurgia estereotáxica e implante dos minipumps osmóticos

No segundo dia de lactação, as ratas foram anestesiadas com 2,2,2 tribromoetanol 250mg/kg e foram submetidas à cirurgia estereotáxica para implantação unilateral de uma cânula visando atingir o ventrículo lateral (coordenadas: AP = -0,4mm; V = -4,0mm; L = -1,6mm), utilizando como referência o bregma.

Os *minipumps* osmóticos (modelo 1007D, Alzet®, Figura 2) foram preenchidos com veículo (salina:tween:DMSO, na proporção de 8:1:1) ou WIN55,212-2 nas concentrações de 10nmol ou 100nmol. Através de um cateter a cânula foi conectada ao *minipump* osmótico, o qual foi alocado no dorso subcutaneamente e promovia liberação constante de 0,5µL das substâncias supracitadas por hora durante 7 dias.

Os animais receberam injeção subcutânea de cetoprofeno (3mg/animal) e imediatamente após a recuperação da cirurgia foram retornadas à caixa moradia juntamente com os filhotes, cuja padronização prévia foi realizada – 4 machos e 4 fêmeas.

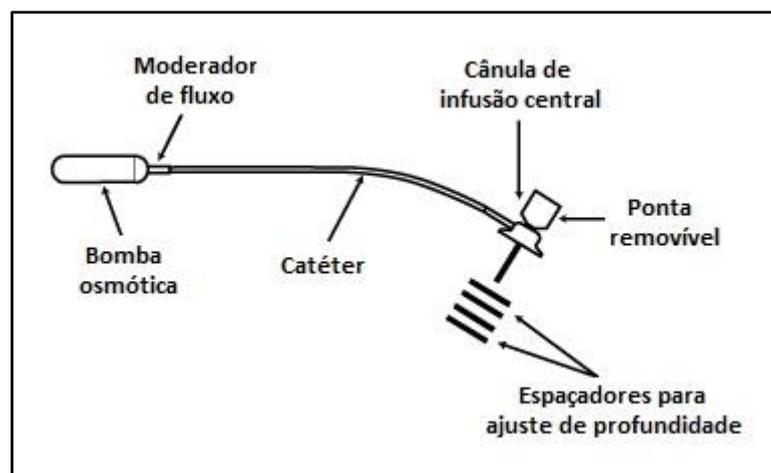


Figura 2 - Modelo do sistema de injeção utilizado.

Fonte: Alzet®, modificado.

3.4 Avaliação do comportamento materno

O comportamento de cada rata lactante foi registrado durante 4 períodos diariamente do 2º até o 21º dia de lactação. Foram 4 sessões diárias de 72 minutos de observação cada, as quais ocorreram em horários regulares, sendo 3 análises durante a fase clara (8:00, 12:00 e 16:00horas) e 1 análise durante a fase escura (20:00horas) do ciclo claro-escuro. Em cada sessão, o comportamento das ratas lactantes foi registrado a cada 3 min, contabilizando um total de 25 observações por período x 4 períodos por dia = 100 observações/rata/dia.

Os comportamentos registrados foram divididos em maternais e não-maternais:

Maternais: - Rata lambendo os filhotes;

- Rata sobre os filhotes em posição arqueada (cifose);
- Rata sobre os filhotes em posição não arqueada;
- Rata em posição passiva: deitada de costas ou de lado;
- Rata construindo o ninho: quando a rata pega o filhote pela boca ou empurra-o para o ninho.

Não-maternais: - Rata alimentando-se;

- Rata não-explorando: quando a rata estiver longe do ninho e sem contato físico com os filhotes;
- Rata explorando o ambiente longe dos filhotes;
- Rata em *self-grooming* (auto-limpeza).

3.5 Avaliação do ganho de peso da ninhada e da mãe

As ratas que foram utilizadas para registro do comportamento materno tiveram o peso próprio e de sua ninhada registrados no segundo dia de lactação e a cada 3 dias consecutivos. Foram então 7 registros de peso nos 2º, 5º, 8º, 11º, 14º, 17º e 20º dias de lactação, cuja escolha foi determinada pelos dias estabelecidos para troca de caixa e serragem.

3.6 Avaliação comportamental dos filhotes na fase adulta

Os filhotes das ratas que foram utilizadas para registro do comportamento materno foram desmamados após a análise do 21º dia de lactação. Os filhotes foram separados por sexo em caixas distintas no 45º dia de vida até serem completas 8 semanas, quando foram submetidos a experimentos. Todos os testes foram realizados no período da manhã, entre às 8:00 às 12:00hs.

3.6.1 *Labirinto em cruz elevado*

Os animais foram colocados no centro de frente para um dos braços fechados e filmados por cinco minutos. As medidas comportamentais registradas foram: frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entradas e tempo) revela um efeito ansiolítico (LISTER, 1987; FILE et al., 1990, CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 10%.

3.6.2 *Campo aberto*

Imediatamente após o teste do labirinto em cruz elevado, os animais foram colocados individualmente em uma arena circular de acrílico com diâmetro de 60 cm e paredes com 50 cm de altura, com o piso dividido em quadrantes, dos quais 8 áreas junto às paredes do aparato foram consideradas periferia e as 4 demais centrais. Cada animal foi colocado no centro da arena e filmado por cinco minutos para posterior análise. Foi registrado o número de cruzamentos com as quatro patas no centro, na periferia, número de *rearings* (animal posiciona-se somente sobre as 2 patas traseiras) e o efeito anti-tigmotático (número de entradas no centro/número total de entradas). Tipicamente os animais tendem a ficar por mais tempo na

periferia em comparação com a área central. Essa preferência é conhecida como tigmotaxia e a diminuição dessa preferência leva ao efeito denominado anti-tigmotático que pode ser referido como uma ação ansiolítica (VALLE, 1970). Este teste também foi utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais analisando o número de entradas com as quatro patas na periferia e o total de cruzamentos. Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 10%.

3.6.3 Medo condicionado ao contexto

A ambientação, condicionamento e teste foram realizados em uma caixa de eletrochoque de dimensões 25x22x22 cm³. A caixa apresenta assoalho com 18 grades metálicas de 2 mm de diâmetro com espaços de 1,5cm entre elas, conectadas a um gerador de eletrochoque. A caixa experimental foi limpa com álcool 10% antes e depois do uso.

A ambientação consistiu em uma pré-exposição de 10 minutos à caixa de choque. No dia seguinte seguiu-se a sessão de condicionamento ao choque, durante a qual os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: condicionados e não condicionados. O grupo condicionado foi re-exposto à caixa e após 4 minutos de habituação os animais foram submetidos a sessões de choque que consistiram em 6 choques nas patas de 1,5mA/3s com intervalos entre eles de 20s a 1min. O grupo não condicionado foi re-exposto à mesma caixa por 10 minutos sem receber nenhum choque.

No terceiro dia, os animais foram submetidos aos testes para avaliação comportamental ou de parâmetros cardiovasculares; tais análises foram realizadas em uma sala diferente da utilizada nos 2 dias anteriores, permanecendo somente o contexto da própria caixa de choque. Metodologia retirada da literatura (LISBOA et al., 2010).

3.6.3.1 *Freezing*

O comportamento de *freezing* é definido como a completa ausência de movimento, quando o animal assume uma característica de postura tensa. Tal resposta evocada pela resposta emocional condicionada ao contexto foi avaliada 24hs após a sessão de condicionamento. A sessão teste consistiu de re-exposição à caixa de choque sem que o mesmo fosse disparado. Os animais foram colocados um por vez na caixa e prosseguiu-se a filmagem por 10 minutos, cada rato foi testado somente uma vez. A análise posterior dos vídeos forneceu o tempo de latência para o primeiro *freezing* e o tempo total que o animal permaneceu nessa posição.

3.6.3.2 Registro de parâmetros cardíacos

Quatro horas após a sessão de condicionamento, os animais (diferentes do grupo utilizado no teste comportamental) foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol 250mg/kg i.p. e um cateter de polietileno (PE-10) de 4 cm de comprimento foi implantado na artéria femoral para aferição da pressão arterial e frequência cardíaca. O cateter foi transpassado sob a pele e exteriorizado no dorso dos animais.

A resposta cardiovascular foi avaliada 24hs depois da sessão de condicionamento. Inicialmente os animais foram transportados para a sala de experimentos e lá permaneceram por 60 minutos em sua caixa moradia para adaptarem ao ambiente. Os animais foram testados um por vez.

Os parâmetros cardiovasculares foram mensurados utilizando-se um transdutor de sinal que acoplado ao cateter arterial permitiu o processamento pelo computador (equipamento AdInstruments®, software LabChart 7 Pro – PowerLab 4/30). Durante 5 minutos foi medida a linha de base e então os animais foram colocados no centro da caixa de choque para medida dos parâmetros cardiovasculares. A sessão teste consistiu de 10 minutos de reexposição do animal à caixa sem que o choque fosse disparado.

3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o software GraphPad versão 3.0 e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação das médias foi aplicado teste de análise de variância (ANOVA) *one* ou *two-way*, seguidas do teste de Dunnet, Newman-Keuls ou Bonferroni. Para a análise do comportamento materno ao longo dos 21 dias, ganho de peso da mãe e da ninhada, *freezing* e avaliação da variação na pressão arterial e frequência cardíaca nos filhotes, foi utilizada ANOVA *two-way*. As demais avaliações – comportamento materno separado em períodos (durante a infusão e após a suspensão da mesma), campo aberto e labirinto – foram analisadas pela ANOVA *one-way*. Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

São descritos os resultados obtidos após a realização dos experimentos.

4.1 Avaliação do comportamento materno

A análise diária do comportamento exibido pelas mães foi realizada ao longo dos 21 dias de lactação (DL), partindo do 2ºDL. Foram identificados 5 parâmetros considerados maternos e 4 não-maternos, sendo que a soma dos mesmos foi representada como comportamento materno total (CMT) e não-materno total (CnMT), respectivamente.

O Gráfico 1A um exibe o perfil do comportamento materno total ($F_{7,159} = 15,08$, $p < 0,0001$), o qual tende a diminuir ao longo dos dias de lactação, tendo o 3º DL como referência, resultado esperado (GROTA; ADER, 1969, 1974; STERN, 1997; PEREIRA; MORREL, 2011). Dos parâmetros diminuídos, apesar de a cifose ser o de maior evidência ($F_{7,159} = 15,29$, $p < 0,0001$, Gráfico 1C), podemos observar também redução na lambida ($F_{7,159} = 8,936$, $p < 0,0001$, Gráfico 1B) e construção do ninho ($F_{7,159} = 3,354$, $p < 0,0001$, Gráfico 1F).

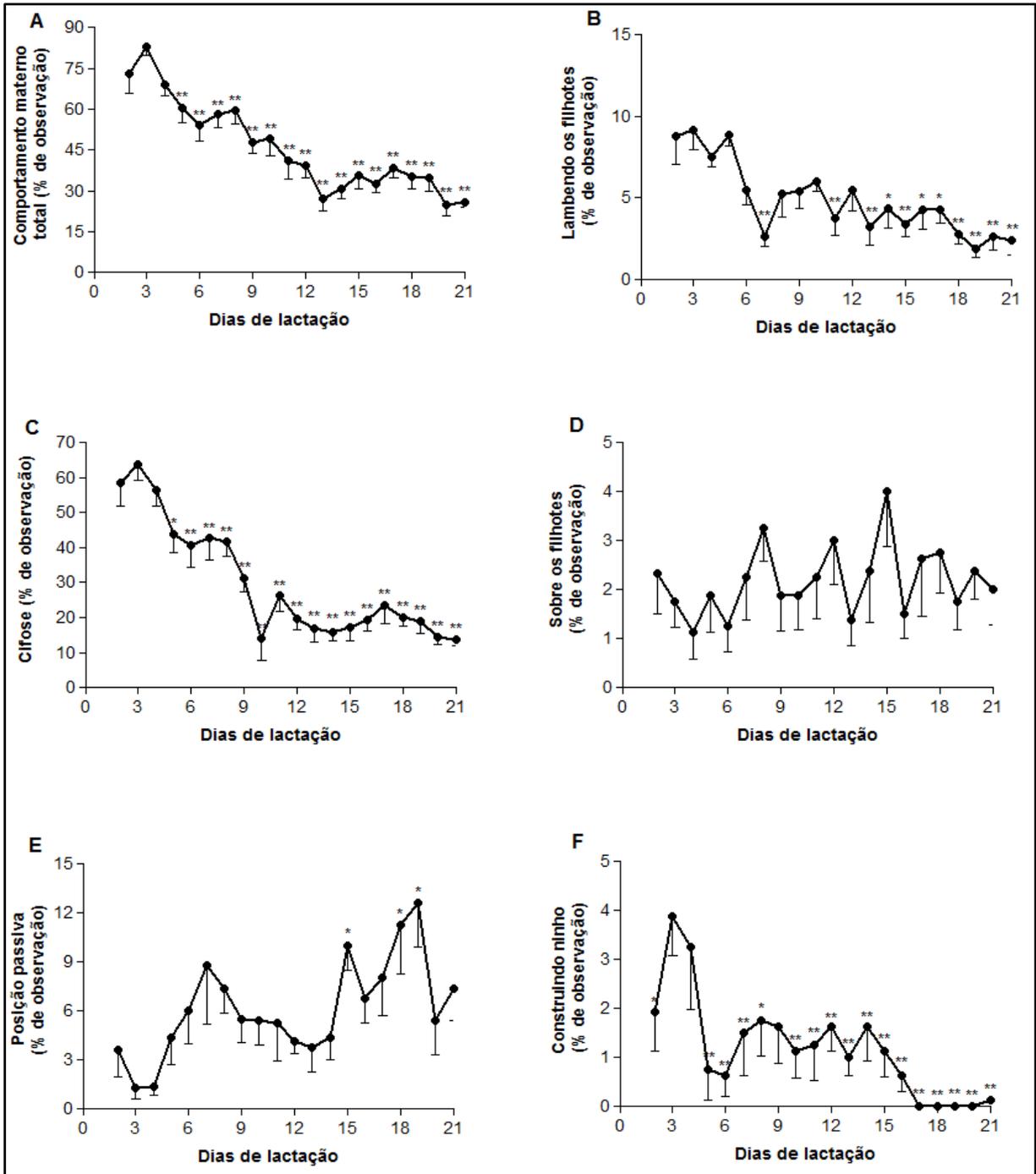


Gráfico 1 - Comportamento materno de ratas ao longo da lactação. Comportamento materno total (A), lambendo os filhotes (B), cifose (C), sobre os filhotes (D), posição passiva (E) e construindo ninho (F). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, quando comparados com o terceiro dia de lactação. *One-way ANOVA* seguido do teste de Dunnet.

Fonte: Da autora.

Conseqüentemente observa-se um aumento do comportamento não-materno total ao longo dos dias de lactação ($F_{7,159} = 15,08$, $p < 0,0001$, Gráfico 2A). Os parâmetros elevados neste caso foram o tempo que a mãe gasta alimentando-se

($F_{7,159} = 6,632$, $p < 0,0001$, Gráfico 2B) e simplesmente longe dos filhotes, não explorando ($F_{7,159} = 9,894$, $p < 0,0001$, Gráfico 2D).

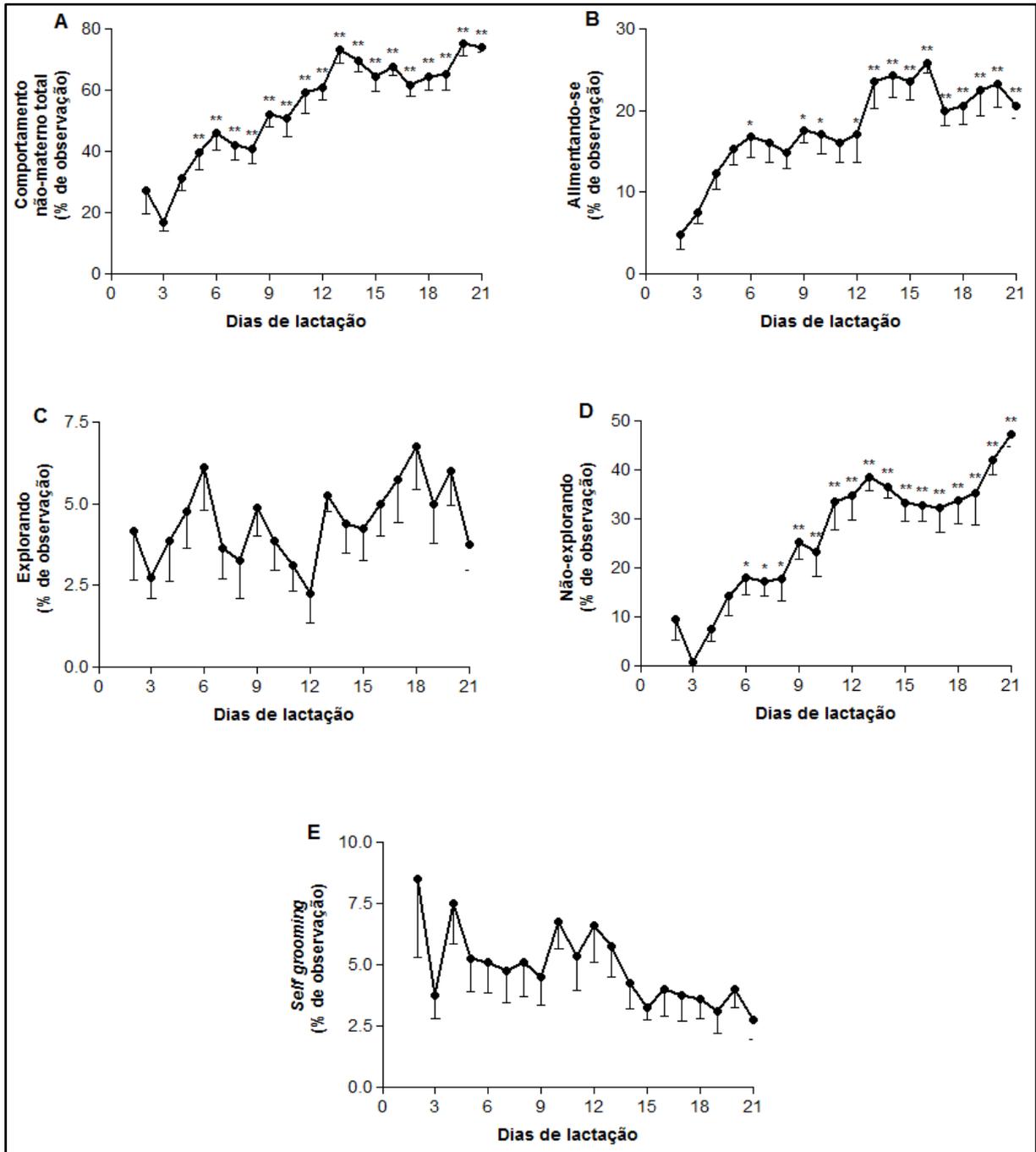


Gráfico 2 - Comportamento não-materno de ratas ao longo da lactação. Comportamento não-materno total (A), alimentando-se (B), explorando o ambiente (C), não-explorando (D) e *self grooming* (E). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, quando comparados com o terceiro dia de lactação. One-way ANOVA seguido do teste de Dunnet.

Fonte: Da autora.

Com relação ao tratamento das ratas com o agonista canabinóide (WIN 55,212-2), é possível observar que o CMT ($F_{2,520} = 27,71$), lambdina ($F_{2,520} = 3,892$)

nos filhotes e cifose ($F_{2,520} = 16,83$) das ratas tratadas com WIN tanto na dose de 10 (n=9) ($p < 0,0001$, $p = 0,0207$, $p = 0,0014$, respectivamente) quanto de 100nmol (n=9) ($p < 0,0001$, $p = 0,0201$, $p < 0,0001$, respectivamente) são estatisticamente diferentes do grupo tratado com veículo (n=11) (Gráfico 3A, 3B e 3C, respectivamente). O ato de construção do ninho apresentou diminuição somente nas lactantes que receberam tratamento com 10nmol de WIN ($F_{2,520} = 4,772$, $p = 0,0022$, Gráfico 3F). Já os demais parâmetros maternos analisados não apresentaram diferença estatística entre os três grupos (Gráfico 3D e 3E).

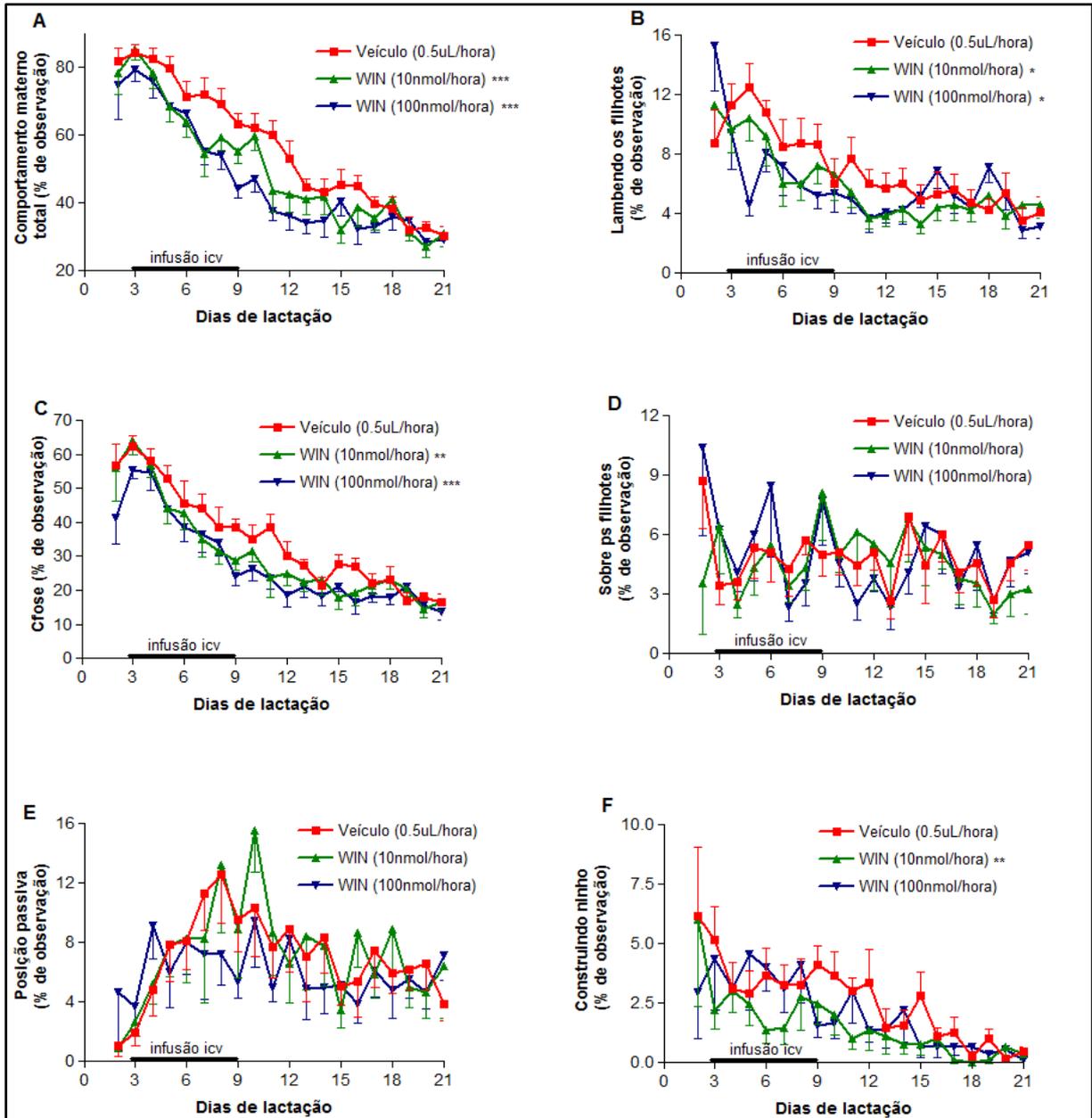


Gráfico 3 - Efeito da infusão crônica de WIN (10 e 100nmol) no comportamento materno de ratas ao longo da lactação. Comportamento materno total (A), lambendo os filhotes (B), cifose (C), sobre os filhotes (D), posição passiva (E) e construindo ninho (F). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparados com o grupo controle. *Two-way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

Por outro lado, o aumento do CnMT ao longo dos dias exibido pelas ratas tratadas ($F_{2,520} = 27,71$, Gráfico 4A) em ambas doses ($p < 0,0001$ para ambas doses) é reflexo do maior tempo despendido por elas para se alimentar ($F_{2,520} = 11,19$; dose de 10nmol: $p = 0,0004$ e dose de 100nmol: $p < 0,0001$, Gráfico 4B), todos comparados com as lactantes controle. Além de estar se alimentando, as ratas também passaram mais tempo explorando o ambiente ($F_{2,520} = 3,904$; dose de 10nmol: $p = 0,0158$ e dose

100nmol: $p=0,0128$, Gráfico 4C) ou longe dos filhotes puramente – não explorando ($F_{2,520}= 51,85$; dose de 100nmol: $p=0,0011$, Gráfico 4D). Já o tempo gasto com auto-limpeza – *self grooming* – não apresentou diferença entre os grupos (Gráfico 4E).

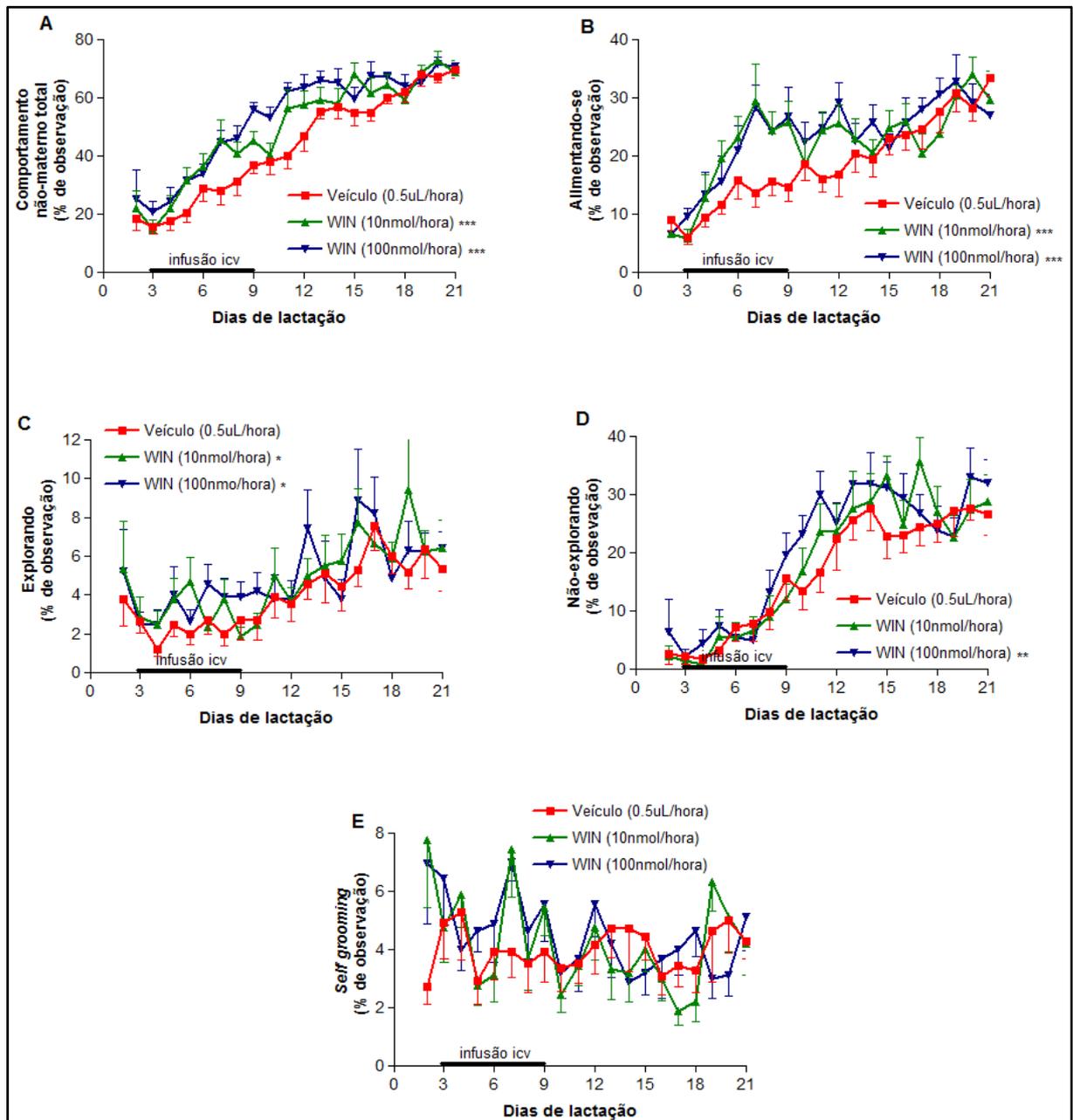


Gráfico 4 - Efeito da infusão crônica de WIN (10 e 100nmol) no comportamento não-materno de ratas ao longo da lactação. Comportamento não-materno total (A), alimentando-se (B), explorando o ambiente (C), não-explorando (D) e *self grooming* (E). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$, quando comparados com o grupo controle. *Two-way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

Como a droga foi administrada no ventrículo lateral somente por 7 dias, separamos a avaliação do comportamento das mães em dois períodos. Um

composto pelos dias de infusão de WIN, do segundo ao nono dia de lactação e outro representando os demais dias até o fim da lactação (10^o ao 21^oDL). Foi realizada a média da soma total de observações nestes períodos, totalizando 700 observações para o primeiro e 1200 para o último.

O comportamento materno total exibido durante o período de infusão da droga foi significativamente diferente entre os grupos tratados com WIN ($F_{2,28}=6,274$; dose de 10nmol: $p<0,05$ e dose de 100nmol: $p<0,01$, Gráfico 5A) e o tratado com veículo. Para as ratas que receberam WIN na dose de 100nmol, o parâmetro diminuído foi a lambida ($F_{2,28}=3,756$, $p<0,05$, Gráfico 5B). Já os demais fatores não sofreram alteração no período em questão (Gráfico 5C, 5D, 5E e 5F).

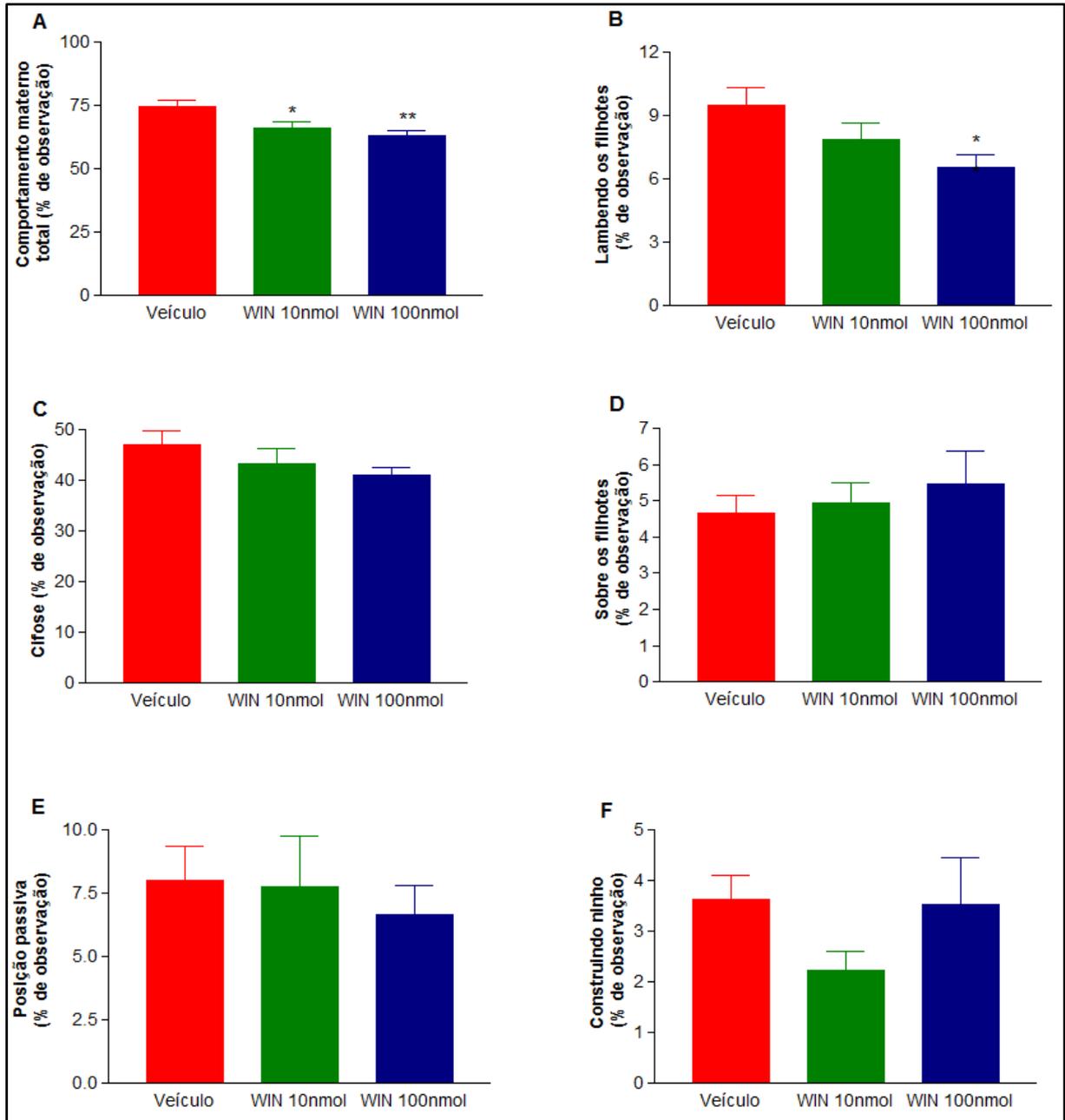


Gráfico 5 - Avaliação do comportamento materno durante a infusão de WIN nas doses de 10 e 100nmol. Comportamento materno total (A), lambendo os filhotes (B), cifose (C), sobre os filhotes (D), posição passiva (E) e construindo ninho (F). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo controle. *One-way ANOVA* seguido do teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

Com relação aos parâmetros não-maternais, observou-se que o aumento do CnMT em ratas tratadas com WIN em ambas doses ($F_{2,28} = 6,274$; dose de 10nmol: $p < 0,05$ e dose de 100nmol: $p < 0,01$, Gráfico 6A) está diretamente relacionado ao maior tempo gasto com a alimentação ($F_{2,28} = 4,678$, $p < 0,05$ para ambas doses, Gráfico 6B). As demais ações realizadas pelas lactantes não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Gráfico 6C, 6D e 6E).

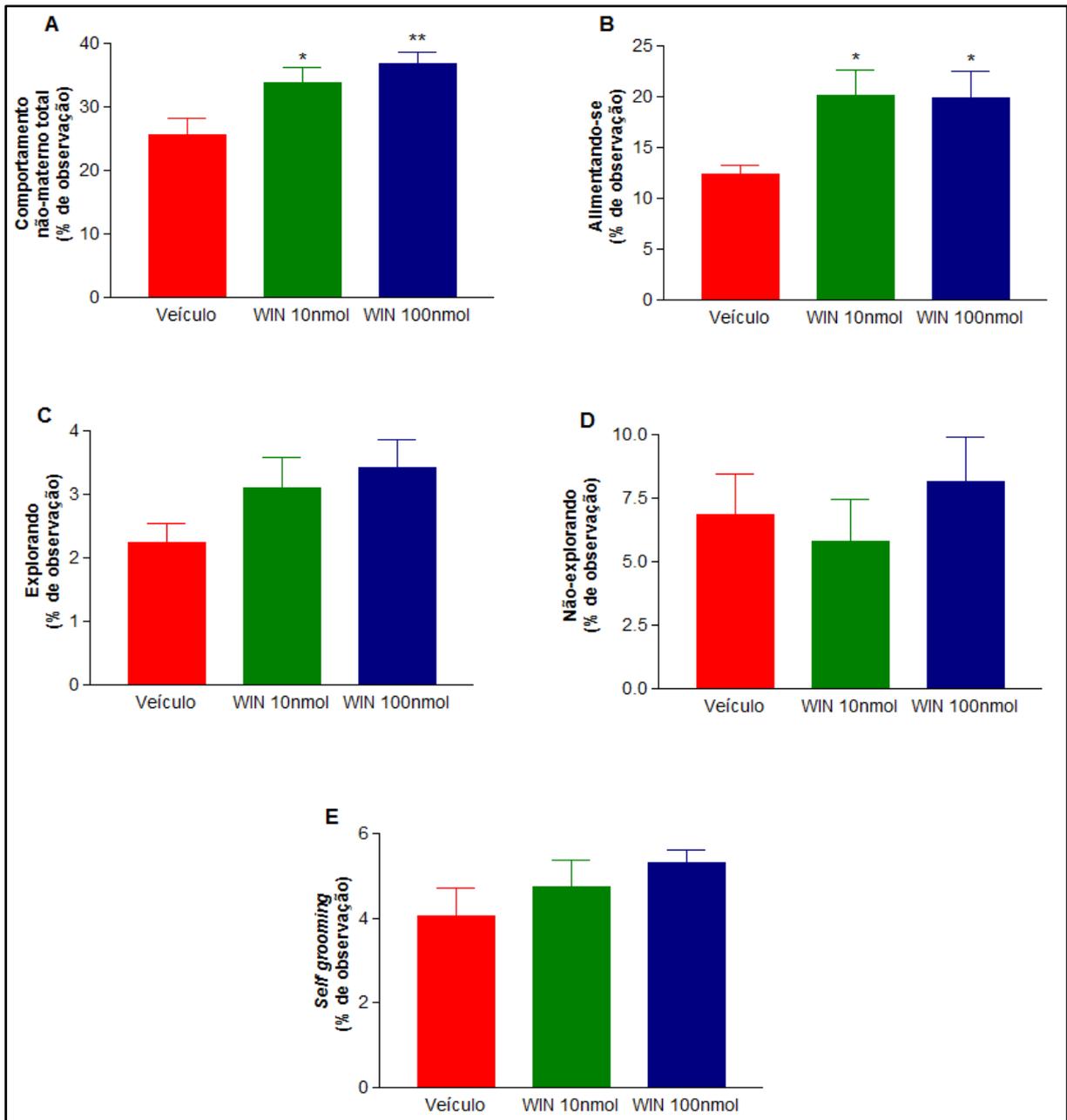


Gráfico 6 - Avaliação do comportamento não-materno durante a infusão de WIN nas doses de 10 e 100nmol. Comportamento não-materno total (A), alimentando-se (B), explorando o ambiente (C), não-explorando (D) e *self grooming* (E). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo controle. *One-way* ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

Mesmo após a interrupção da administração da droga, as análises comportamentais permaneceram até o 21º dia de lactação. O agrupamento dos dados correspondente aos dias subsequentes ao tratamento permitiu verificar a permanência da alteração no comportamento materno total das ratas ($F_{2,28} = 6,430$; dose de 10nmol: $p < 0,05$ e dose de 100nmol: $p < 0,01$, Gráfico 7A). Contudo, os

parâmetros isolados que sofreram diminuição foram outros: construção do ninho para as ratas tratadas com WIN na dose de 10nmol ($F_{2,28}= 3,267$, $p<0,05$, Gráfico 7F) e cifose para as que receberam 100nmol ($F_{2,28}= 4,069$, $p<0,05$, Gráfico 7C). Os demais fatores não apresentaram diferença estatística quando comparados com o grupo controle.

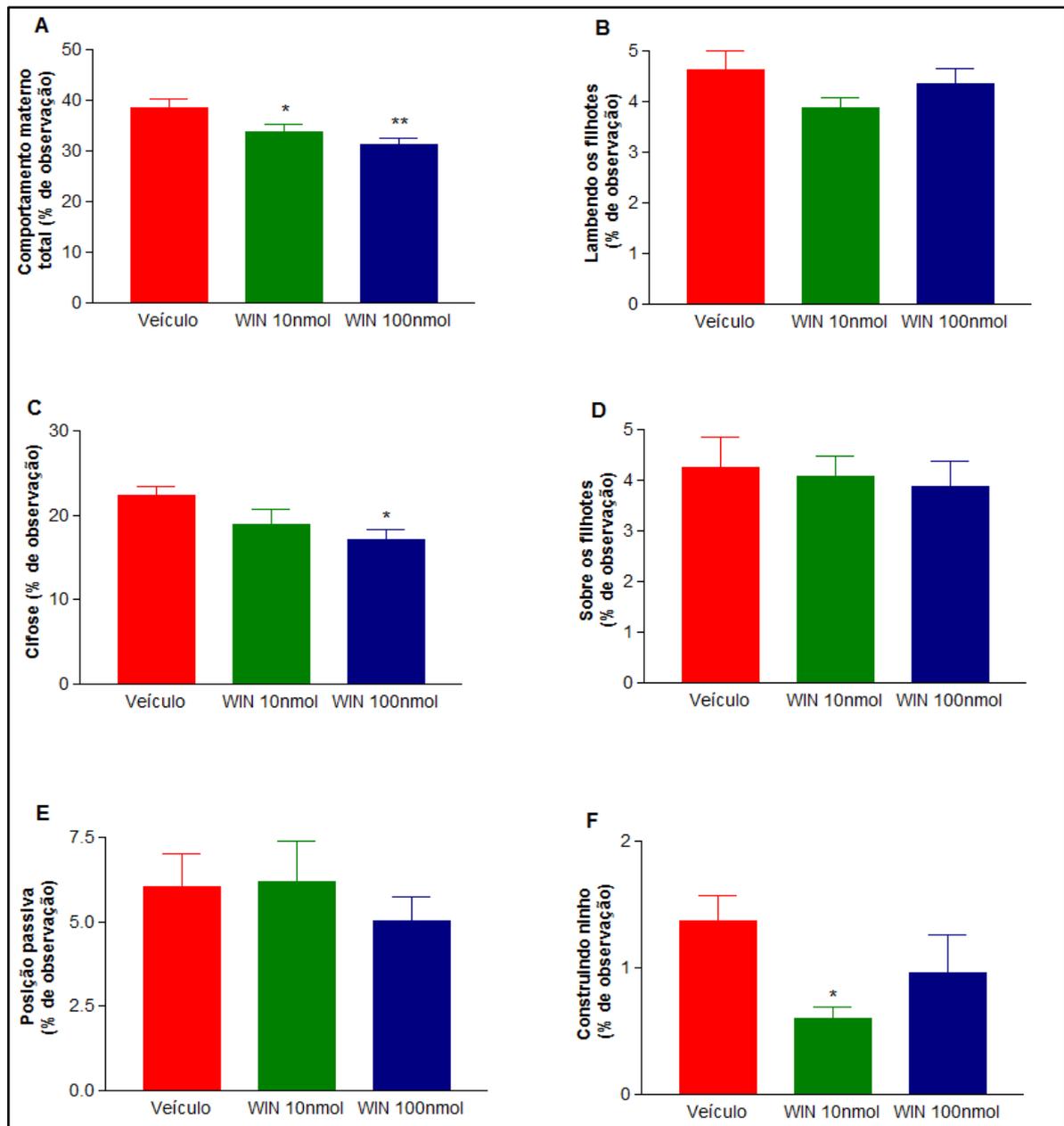


Gráfico 7 - Avaliação do comportamento materno após suspensão da infusão de WIN. Comportamento materno total (A), lambendo os filhotes (B), cifose (C), sobre os filhotes (D), posição passiva (E) e construindo ninho (F). * $p<0,05$ e ** $p<0,01$, quando comparados com o grupo controle. *One-way* ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls.
Fonte: Da autora.

Por outro lado e conseqüentemente, o comportamento não-materno total também permaneceu alterado tanto para as ratas tratadas com 10nmol ($p < 0,05$) quanto para as que receberam 100nmol ($p < 0,01$) de WIN, quando comparadas com o grupo controle ($F_{2,26} = 6,430$, Gráfico 8A). Porém, não foi possível identificar um parâmetro específico que contribuísse diretamente para esse aumento (Gráfico 8B, 8C, 8D e 8E), haja vista que a ausência da droga fez com que seu efeito conhecidamente orexígeno se esvaísse.

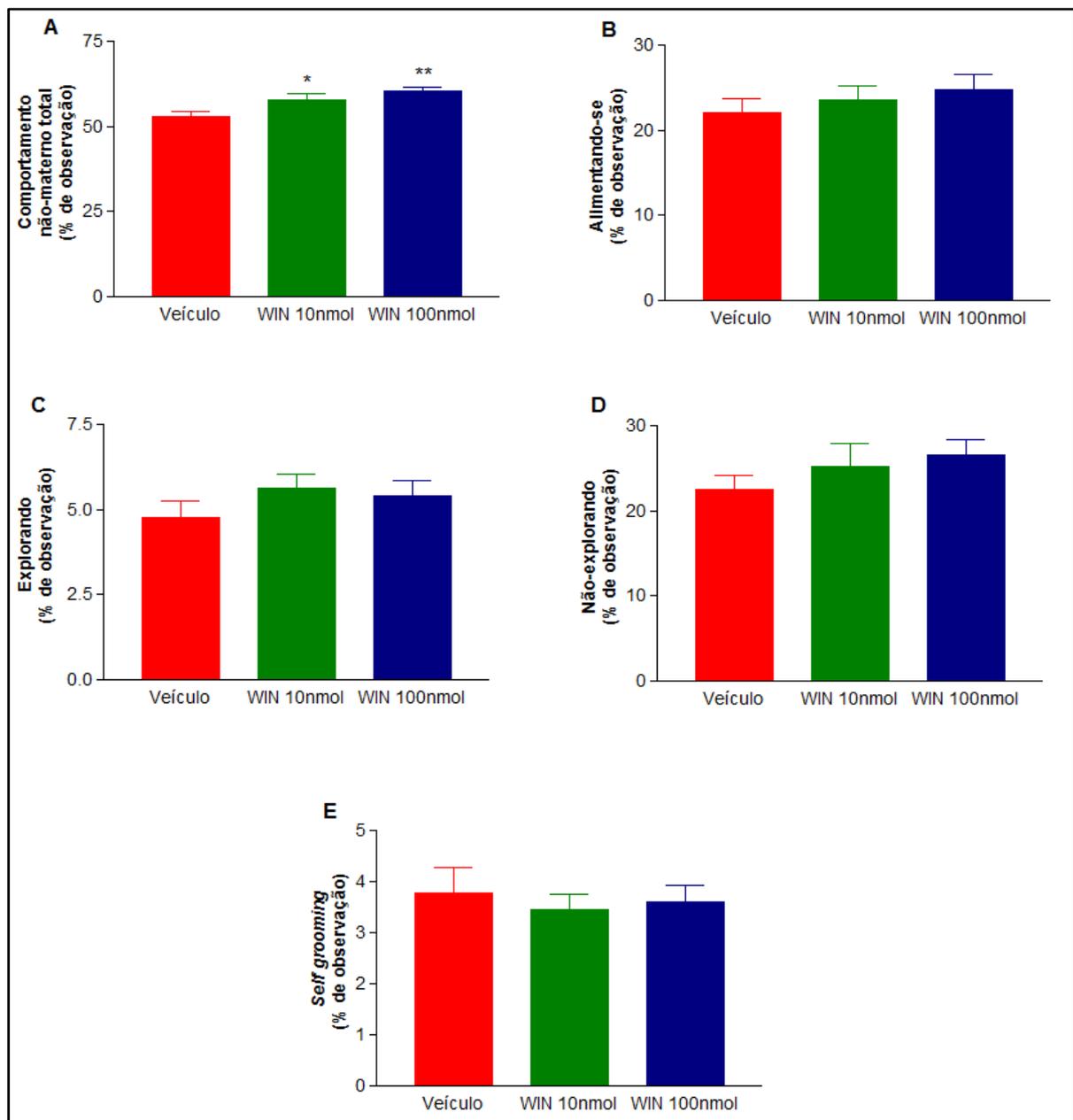


Gráfico 8 - Avaliação do comportamento materno após suspensão da infusão de WIN. Comportamento não-materno total (A), alimentando-se (B), explorando o ambiente (C), não-explorando (D) e *self grooming* (E). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo controle. *One-way ANOVA* seguido do teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

4.2 Avaliação do ganho de peso da ninhada

O monitoramento do peso da rata lactante e de sua ninhada (4 machos e 4 fêmeas) foi realizado de 3 em 3 dias até o desmame. Comparando-se com o primeiro intervalo de pesagem (do segundo ao quinto dia de lactação) é claro o aumento no ganho de peso da ninhada ($F_{7,47}= 13,67$, $p<0,0001$, Gráfico 9A). Por outro lado, observa-se que a velocidade desse ganho de peso ao longo dos dias diminui, quando comparada com o primeiro intervalo de pesagem ($F_{7,47}= 51,02$, $p<0,0001$, Gráfico 9B).

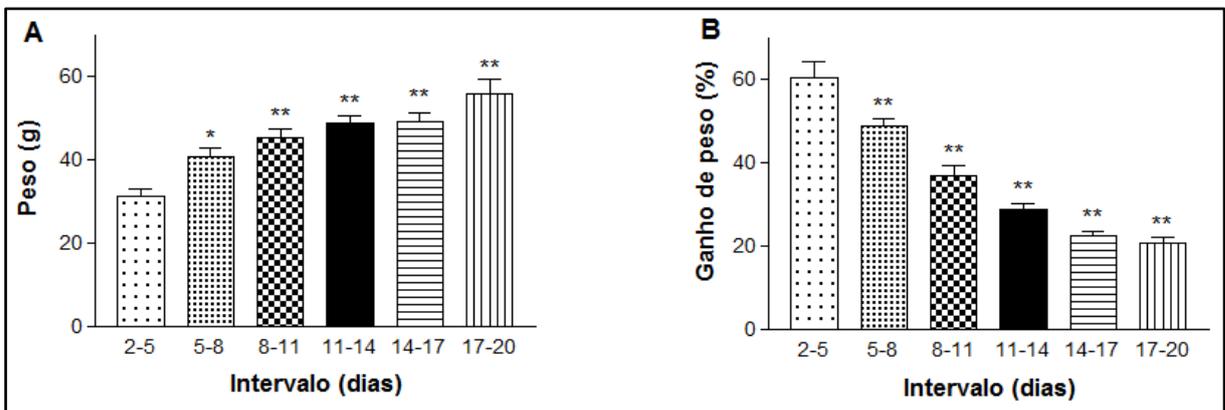


Gráfico 9 - Avaliação do ganho de peso da ninhada por intervalos diários. Diferença do ganho de peso da ninhada em gramas (A) e velocidade do ganho de peso da ninhada em porcentagem (B). *, $p<0,05$ e **, $p<0,01$, quando comparados com o primeiro intervalo de pesagem (do segundo ao quinto dias de lactação). *One-way* ANOVA seguido do teste de Dunnett.

Fonte: Da autora.

A variação no peso dos filhotes não apresentou diferença estatística na comparação dos três grupos – ratas tratadas com veículo e WIN nas doses de 10 e 100nmol (Gráfico 10A). Por outro lado, foi possível observar que as lactantes tratadas com a droga, tiveram um aumento no ganho de peso quando comparadas com as ratas controle ($F_{2,183}= 4,244$; dose de 10nmol: $p=0,0224$ e dose de 100nmol: $p=0,0082$, Gráfico 10B).

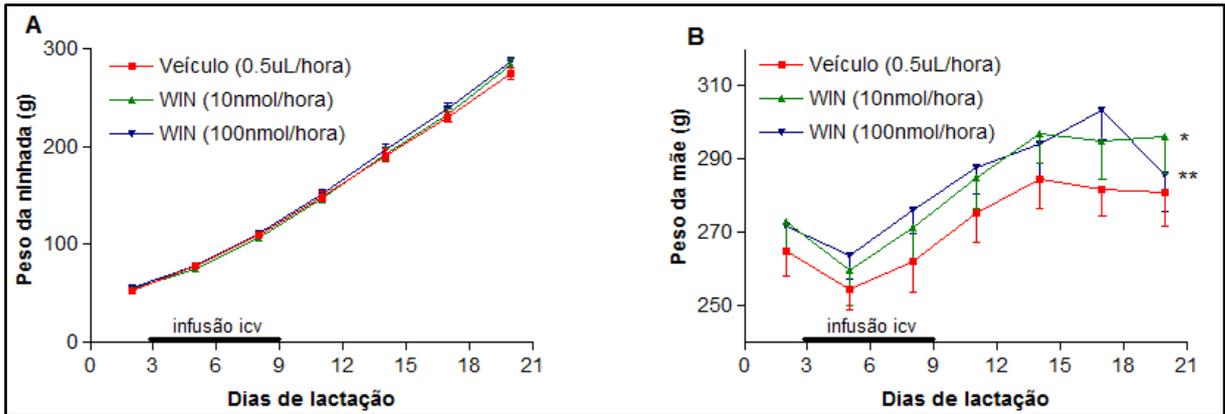


Gráfico 10 - Efeito da infusão crônica de WIN (10 e 100nmol) no ganho de peso da ninhada (A) e da mãe (B). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo controle. *Two-way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

4.3 Avaliação comportamental dos filhotes machos em idade adulta

Seguem os resultados obtidos pela avaliação comportamental dos filhotes machos na nona semana de vida.

4.3.1 Labirinto em cruz elevado

Esse aparato foi utilizado para avaliação de comportamento relacionado à ansiedade, no qual os braços abertos consistem em ambiente aversivo. Uma maior permanência e/ou entrada nestes braços abertos pode indicar que os animais são mais destemidos que os animais que preferem se refugiar nos braços fechados.

Na Gráfico 11, pode-se observar que não houve diferença significativa - em nenhum parâmetro do labirinto em cruz elevado - entre os filhotes de mães controles ($n=16$) e tratadas com WIN nas doses de 10 ($n=16$) e 100nmol ($n=16$).

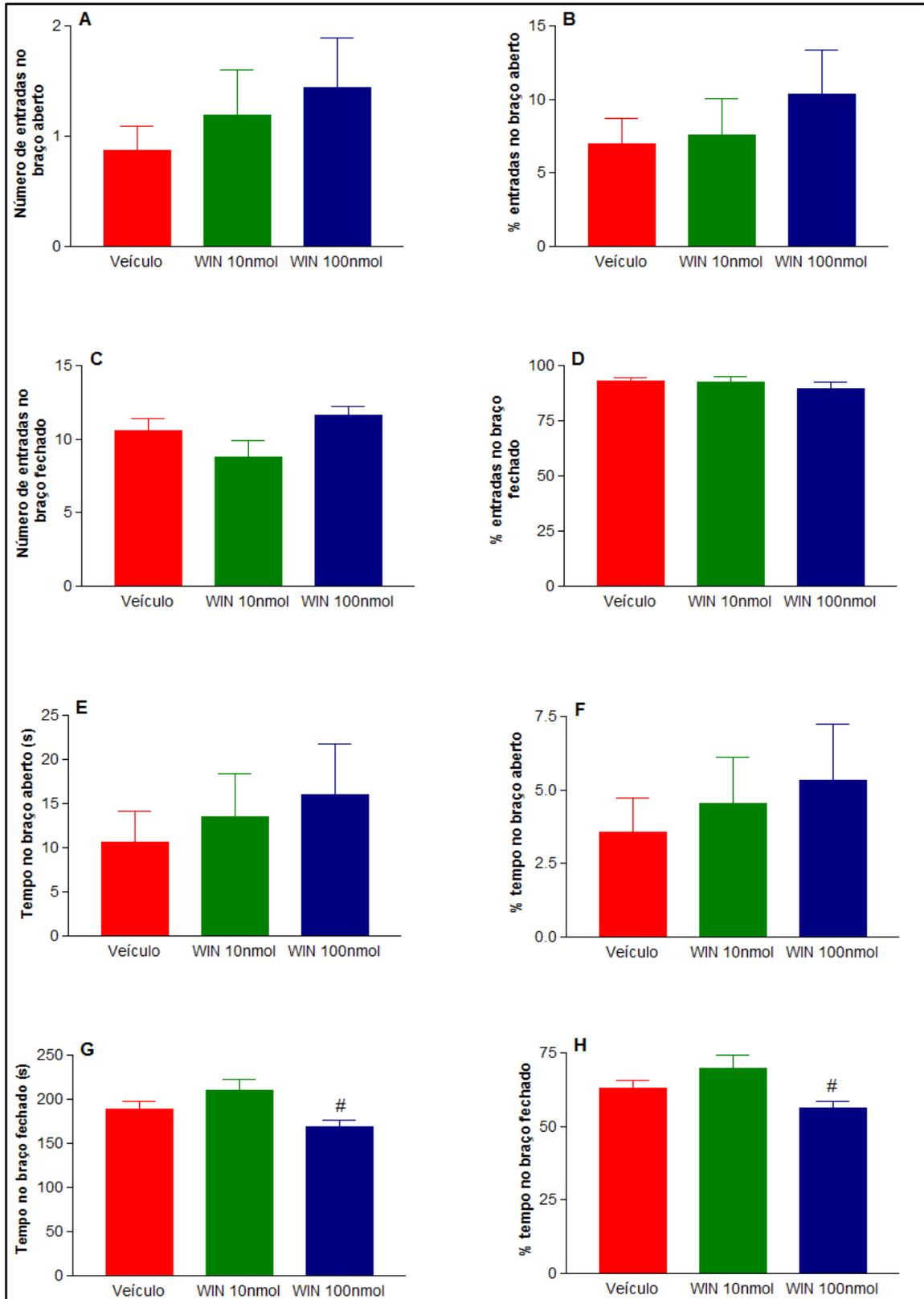


Gráfico 11 - Labirinto em cruz elevado de filhotes machos de mães tratadas com veículo (controle) ou WIN nas doses de 10 e 100nmol. Número de entradas no braço aberto (A), % de entradas no braço aberto (B), número de entradas no braço fechado (C), % de entrada no braço fechado (D), tempo no braço aberto (E), % de tempo no braço aberto (F), tempo no braço fechado (G) e % de tempo no braço fechado (H). *One-way* ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

4.3.2 Campo aberto

O teste de campo aberto foi utilizado com a finalidade de avaliação da atividade locomotora e efeito anti-tigmotático. Esse último, representado pela razão de entradas no centro sobre o número total de entradas, indica comportamento contrário ao habitual desses animais que é buscar contato das fibrícias com a parede do aparato. Uma elevação neste comportamento pode indicar diminuição de comportamento relacionado à ansiedade.

Nossos resultados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos no número de entradas na periferia, no total de entradas e na razão de entradas no centro sobre o total de entradas. Porém, foi observado, em filhotes de mães tratadas com a droga na dose de 100nmol (n=16), um aumento no número de entradas no centro ($F_{2,47}= 4,157$, $p<0,05$, Gráfico 12A) e número de *rearing* ($F_{2,47}= 3,520$, $p<0,05$, Gráfico 12C) quando comparados aos filhotes de mães tratadas com veículo (n=16).

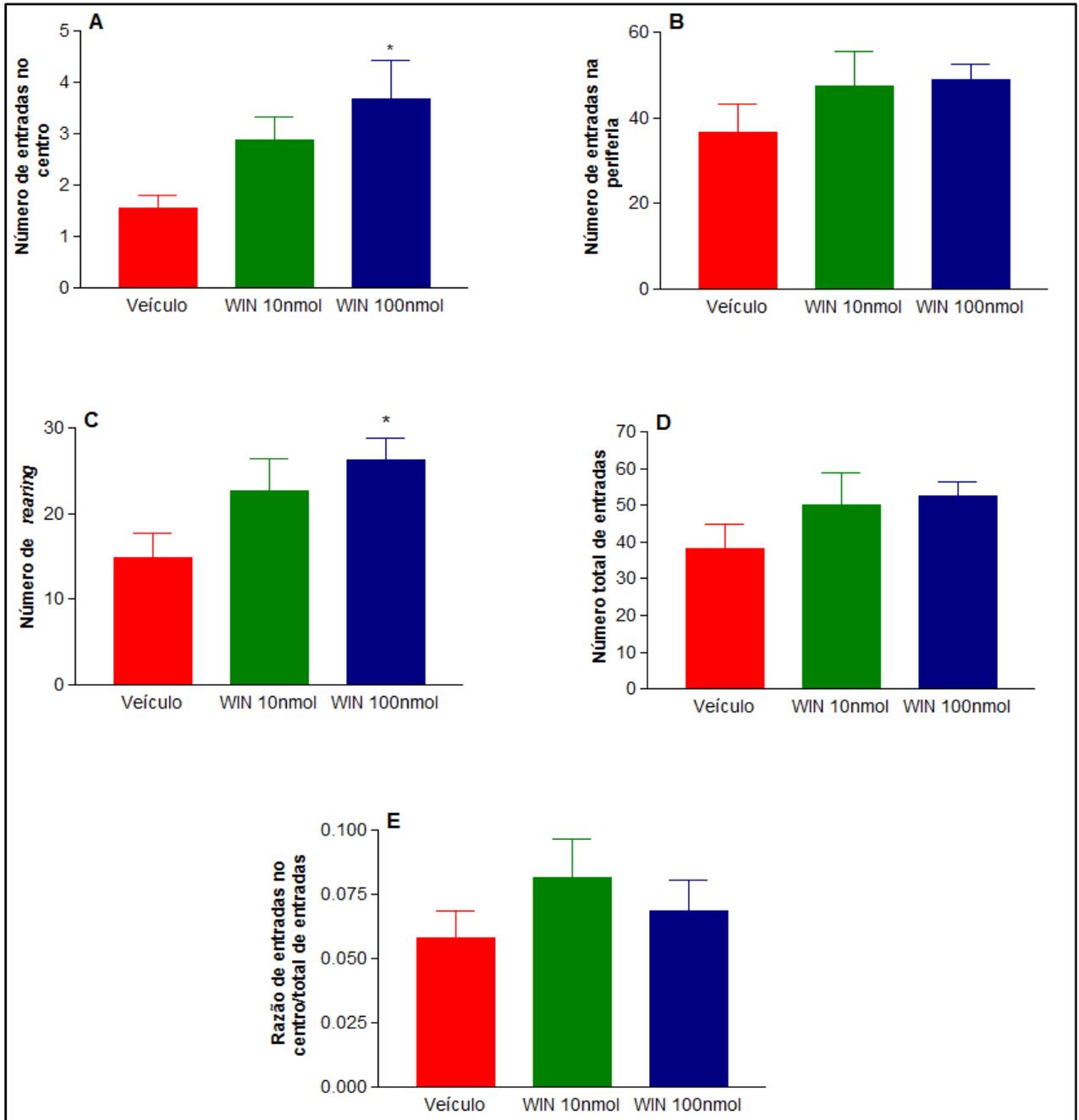


Gráfico 12 - Campo aberto de filhotes adultos machos de mães tratadas com veículo (controle) ou WIN nas doses de 10 e 100nmol. Número de entradas no centro (A), número de entradas na periferia (B), número de *rearing* (C), número total de entradas (D) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (E). Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$, quando comparado com o controle. *One-way* ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

4.3.3 Medo condicionado ao contexto

Os resultados do teste de medo condicionado ao contexto foram divididos em análise comportamental de *freezing* e avaliação de parâmetros cardiovasculares.

4.3.3.1 *Freezing*

O grupo de animais que não sofreu choque nas patas tinha puramente a caixa teste como um ambiente aversivo. Já o grupo que foi condicionado ao choque identificava tal ambiente aversivo como uma ameaça, pois havia recebido estímulo doloroso naquele mesmo local. Assim, o comportamento de *freezing* exibido por ambos os grupo é correlacionado com resposta de medo.

No tempo de latência para o primeiro *freezing* o tratamento ($F_{5,50}= 8,869$, $p=0,0005$) e o condicionamento ($F_{5,50}= 47,94$, $p<0,0001$) apresentaram diferença estatística entre os grupos, além de haver interação entre os fatores ($F_{5,50}= 3,329$, $p=0,0439$).

O tempo de latência para o primeiro *freezing* dos grupos não-condicionados (Gráfico 13A) foi menor nos filhotes machos de mães tratadas com WIN e ambas doses ($n=8$, $p<0,001$) quando comparados com a prole de mães controle ($n=7$). Utilizando o mesmo grupo anterior como comparação, observou-se que os filhotes de mães controle do grupo condicionado ($n=8$, $p<0,001$) também apresentaram diferença estatisticamente significativa. Além disso, a prole oriunda de mães tratadas com WIN na dose de 10nmol, também apresentou diferença, sendo que o grupo condicionado ($n=8$) exibiu seu primeiro *freezing* antes do grupo não condicionado ($p<0,05$), o mesmo ocorre com a dose de 100nmol ($n=8$, $p<0,01$).

Com relação ao tempo total de *freezing* o condicionamento apresentou significância ($F_{5,50}= 74,44$, $p<0,0001$, Gráfico 13B). É possível observar que o grupo de descendentes condicionados de mães tratadas com veículo é estatisticamente maior quando comparado com os filhotes não condicionados de mães controle ($p<0,001$ para os 3 casos). Já quando comparamos filhotes condicionados e não-condicionados oriundos de mães que sofreram o mesmo tratamento – 10 e 100nmol

– também é possível identificar diferença significativa ($p < 0,001$ para ambas doses). Por fim, pode-se verificar, dentro do grupo condicionado, aumento no tempo de *freezing* da prole que descende de mães tratadas com WIN 10nmol quando comparada com a de mães tratadas com veículo ($p < 0,05$).

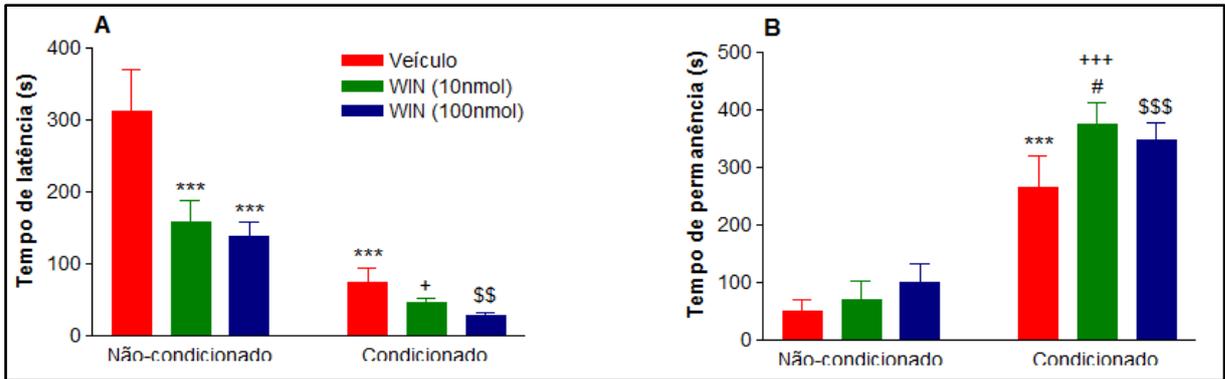


Gráfico 13 - Teste de medo condicionado ao contexto de descendentes machos em idade adulta de mães tratadas com veículo e WIN nas doses de 10 e 100nmol. Tempo de latência para exibição do primeiro *freezing* (A) e tempo total permanecido nessa mesma posição (B). *** $p < 0,001$, quando comparado com filhotes não-condicionados de mãe controle; # $p < 0,05$, quando comparado com filhotes condicionados de mães controle; + $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$, quando comparado com filhotes não-condicionados de mães tratadas com WIN na dose de 10nmol; \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$, quando comparado com filhotes não-condicionados de mães tratadas com WIN na dose de 100nmol. *Two-way* ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

4.3.3.2 Parâmetros cardíacos

Os animais passaram pelas mesmas etapas nos testes para o *freezing*, porém no dia do teste a pressão arterial e frequência cardíaca é que foram aferidas. A finalidade consistiu em avaliar se as alterações comportamentais observadas acompanham alterações autonômicas.

Filhotes machos – não condicionados ao choque ($n=7$ para cada grupo) - de mães que receberam o tratamento com WIN na dose de 10nmol apresentaram diminuição na variação tanto da pressão arterial média ($F_{2,267} = 12,37$, $p=0,0002$) quanto na frequência cardíaca ($F_{2,267} = 61,92$, $p=0,0012$) quando comparados com os filhotes de mães controle (Gráfico 14A e 14C, respectivamente).

Quando os animais passaram pelo desafio do choque nas patas, observa-se que há aumento na frequência cardíaca também no grupo de 10nmol ($n=6$, $F_{2,267}=50,24$, $p<0,0001$, Gráfico 14D). Além disso, a frequência cardíaca dos grupos condicionados apresentou interação entre os tratamentos e o tempo ($F_{2,267}=2,105$, $p=0,0015$). Já a pressão arterial dos animais condicionados não apresentou diferença significativa (Gráfico 14B).

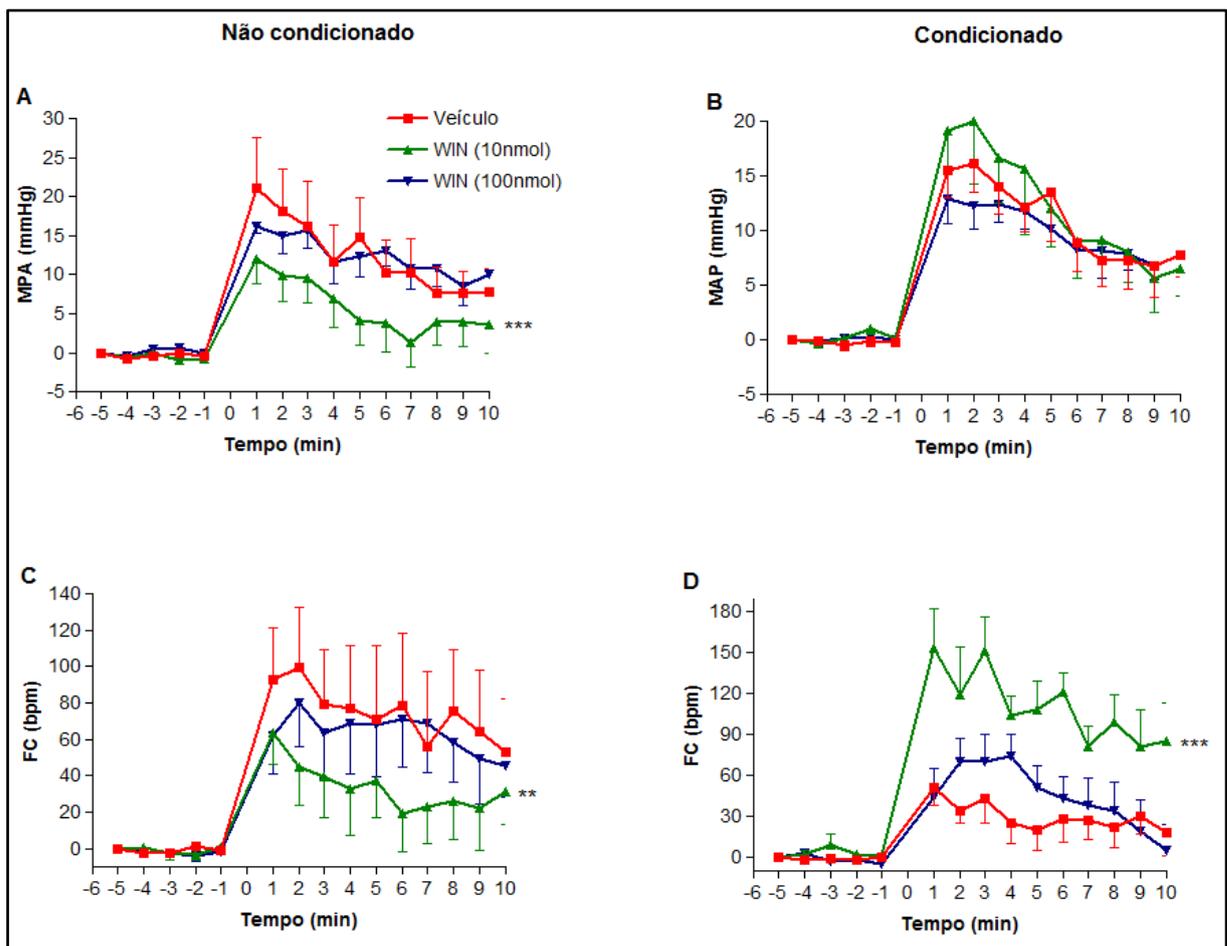


Gráfico 14 - Variação da média da pressão arterial (Δ MPA) e da frequência cardíaca (Δ FC) de descendentes condicionados (A e C, respectivamente) ou não (B e D, respectivamente) ao choque. ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$, quando comparados com filhotes de mães tratadas com veículo. *Two-way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

4.4 Avaliação comportamental dos filhotes fêmeas em idade adulta

Seguem os resultados obtidos pela avaliação comportamental dos filhotes fêmeas na nona semana de vida.

4.4.1 Labirinto em cruz elevado

No Gráfico 15, pode-se observar que não houve diferença significativa - em nenhum parâmetro do labirinto em cruz elevado - entre os filhotes de mães controles (n=16) e tratadas com WIN nas doses de 10 (n=16) e 100nmol (n=16).

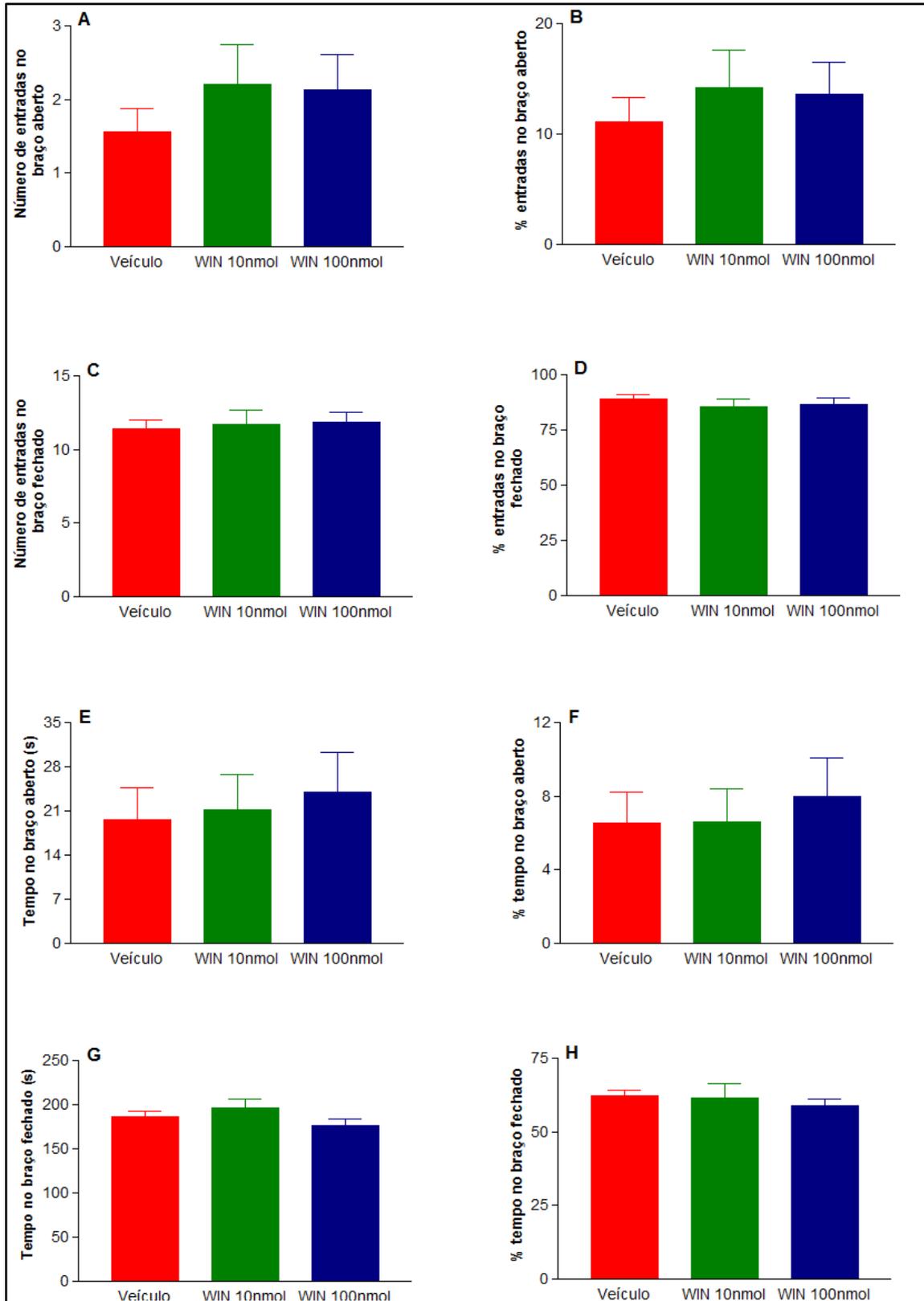


Gráfico 15 - Labirinto em cruz elevado de filhotes fêmeas de mães tratadas com veículo (controle) ou WIN nas doses de 10 e 100nmol. Número de entradas no braço aberto (A), % de entradas no braço aberto (B), número de entradas no braço fechado (C), % de entrada no braço fechado (D), tempo no braço aberto (E), % de tempo no braço aberto (F), tempo no braço fechado (G) e % de tempo no braço fechado (H). *One-way ANOVA* seguido do teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

4.4.2 Campo aberto

O teste de campo aberto mostra que não houve diferença significativa entre os grupos no número de entradas na periferia, no total de entradas e na razão de entradas no centro sobre o total de entradas. Porém, foi observado, em filhotes de mães tratadas com a droga na dose de 100nmol (n=16), um aumento no número de entradas no centro ($F_{2,47}= 3,466$, $p<0,05$, Gráfico 16A) e número de *rearing* ($F_{2,47}= 3,352$, $p<0,05$, Gráfico 16C) quando comparados aos filhotes de mães tratadas com veículo (n=16).

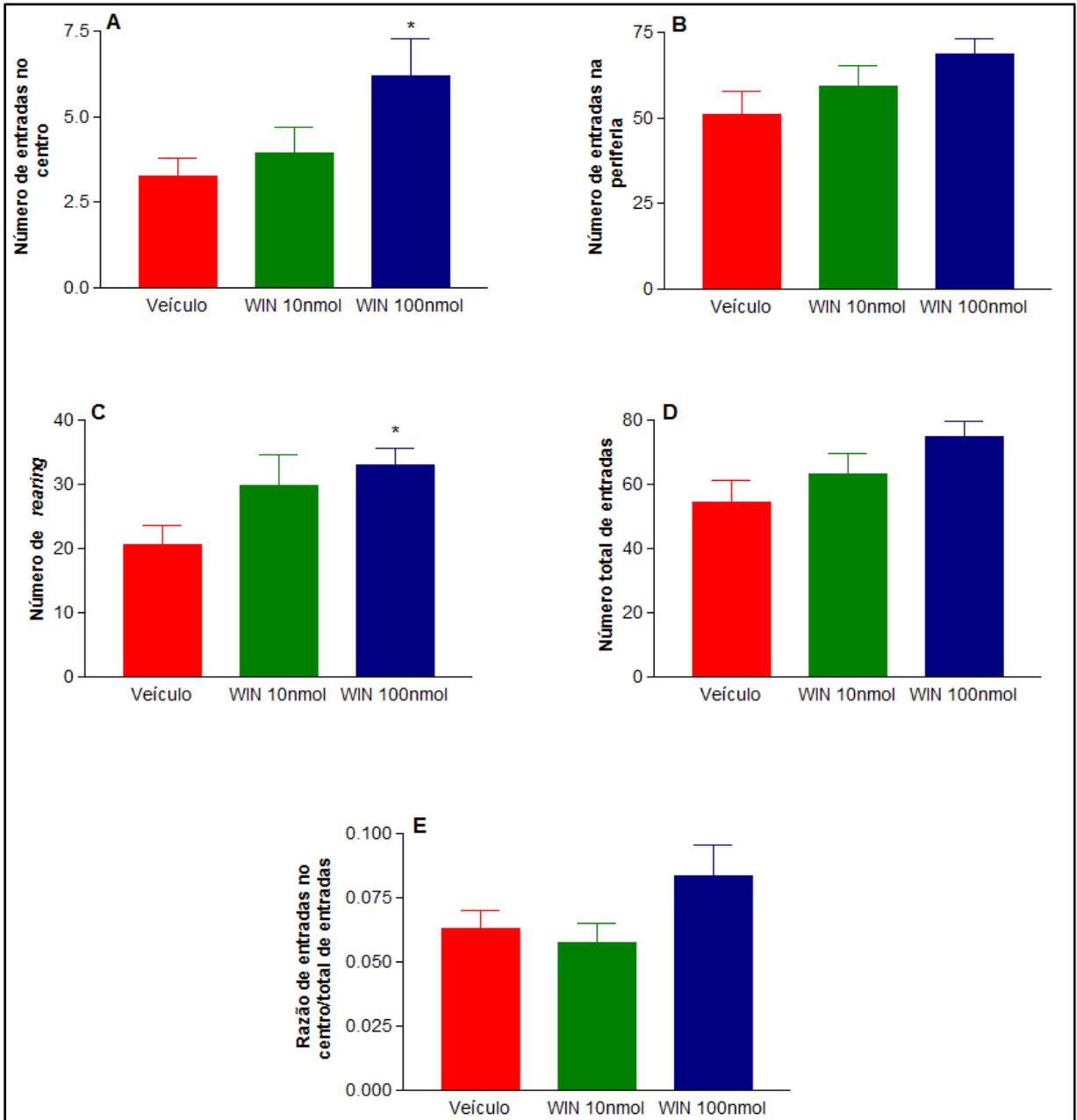


Gráfico 16 - Campo aberto de filhotes adultos fêmeas de mães tratadas com veículo (controle) ou WIN nas doses de 10 e 100nmol. Número de entradas no centro (A), número de entradas na periferia (B), número de *rearing* (C), número total de entradas (D) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (E). Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$, quando comparado com o controle. *One-way* ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

4.4.3 Medo condicionado ao contexto

Os resultados do teste de medo condicionado ao contexto foram divididos em análise comportamental de *freezing* e avaliação de parâmetros cardiovasculares.

4.4.3.1 *Freezing*

No tempo de latência para o primeiro *freezing* ($F_{5,50} = 5,5880$, $p = 0,0190$) e tempo total de permanência em *freezing* ($F_{5,50} = 22,40$, $p < 0,0001$), o condicionamento apresentou diferença estatística entre os grupos.

O tempo de latência para o primeiro *freezing* do grupo não-condicionado (Gráfico 17A) foi maior nos filhotes fêmeas de mães tratadas com WIN na dose de 10nmol ($n = 10$) quando comparados com a prole de mães controle ($n = 8$, $p < 0,05$). Enquanto que a prole de mães tratadas com a mesma dose são estatisticamente diferentes comparando-se os grupos não-condicionado e condicionado ($n = 9$, $p < 0,05$). Porém, os animais provenientes de mães submetidas à administração de WIN na dose de 100nmol ($n = 10$, tanto para o grupo condicionado quanto para o não-condicionado) não apresentaram diferença estatística comparadas aos das mães tratadas com veículo.

Com relação ao tempo total de *freezing* (Gráfico 17B) foi possível observar que descendentes condicionados de mães tratadas com veículo, dose de 10 e de 100nmol permanecem mais tempo em *freezing* quando comparados com os mesmos tratamentos correspondentes ao grupo não-condicionado ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Esses resultados indicam que o recebimento de estímulo aversivo acentuou a resposta de medo, porém não houve diferença estatisticamente significativa comparando-se separadamente os grupos condicionados e não-condicionados.

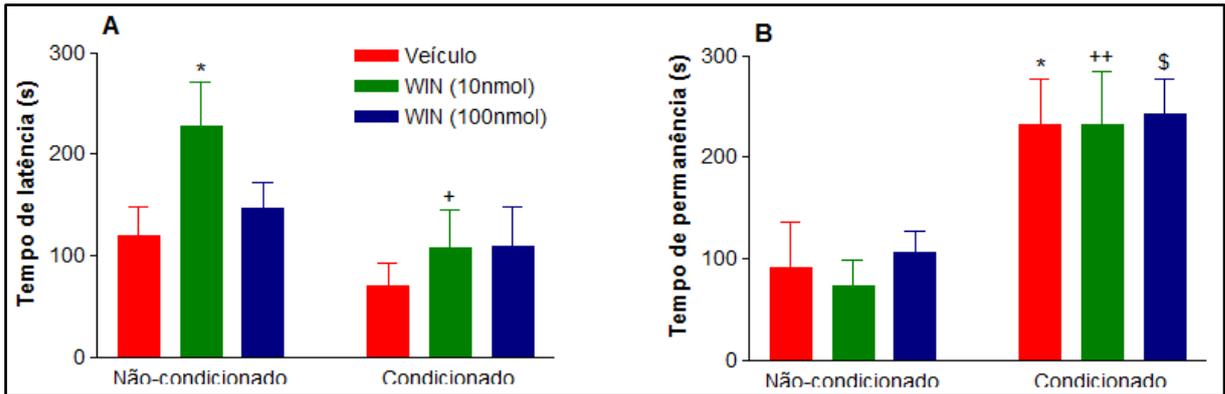


Gráfico 17 - Teste de medo condicionado ao contexto de descendentes fêmeas em idade adulta de mães tratadas com veículo e WIN nas doses de 10 e 100nmol. Tempo de latência para exibição do primeiro *freezing* (A) e tempo total permanecido nessa mesma posição (B). * $p < 0,05$, quando comparado com filhotes não-condicionados de mãe controle; + $p < 0,05$, + $p < 0,01$ quando comparado com filhotes não-condicionados de mães tratadas com WIN na dose de 10nmol; \$ $p < 0,05$ quando comparado com filhotes não-condicionados de mães tratadas com WIN na dose de 100nmol. *Two-way* ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

4.4.3.2 Parâmetros cardíacos

Tanto na avaliação da pressão arterial quanto da frequência cardíaca dos grupos não condicionados, houve interação entre o tempo e os tratamentos ($F_{2,267} = 1,743$, $p = 0,0142$).

Filhotes fêmeas – não condicionadas ao choque - de mães que receberam o tratamento com WIN em ambas as doses ($F_{2,267} = 32,21$; dose de 10nmol: $p = 0,0064$ e dose de 100nmol: $p < 0,0001$) apresentaram diferença significativa na variação da pressão arterial média quando comparadas com filhotes de mães controle (Gráfico 18A). Ainda com relação ao grupo não desafiado ao choque nas patas, a prole de mães tratadas com WIN na dose 100nmol ($F_{2,267} = 68,44$, $p < 0,0001$) apresentou aumento no delta da frequência cardíaca quando comparada com o grupo controle (Gráfico 18C).

Por outro lado, quando os animais passaram pelo desafio do choque nas patas, observa-se que há diminuição na frequência cardíaca das fêmeas descendentes de mães que receberam administração de 100nmol de WIN ($F_{2,267} = 5,940$, $p = 0,0022$), quando comparados com mães tratadas com veículo (Gráfico

18D). Já a pressão arterial dos animais condicionados não apresentou diferença significativa (Gráfico 18B).

O ambiente aversivo por si é capaz de produzir elevação na pressão arterial média de filhotes fêmeas de mães tratadas nas duas doses de WIN. Diferença esta que é abolida quando os animais recebem estímulo aversivo no dia anterior ao teste. Com relação aos animais não-condicionados da dose de 100nmol, a frequência cardíaca acompanha o aumento da pressão arterial o que contrariamente não ocorre com a dose de 10nmol.

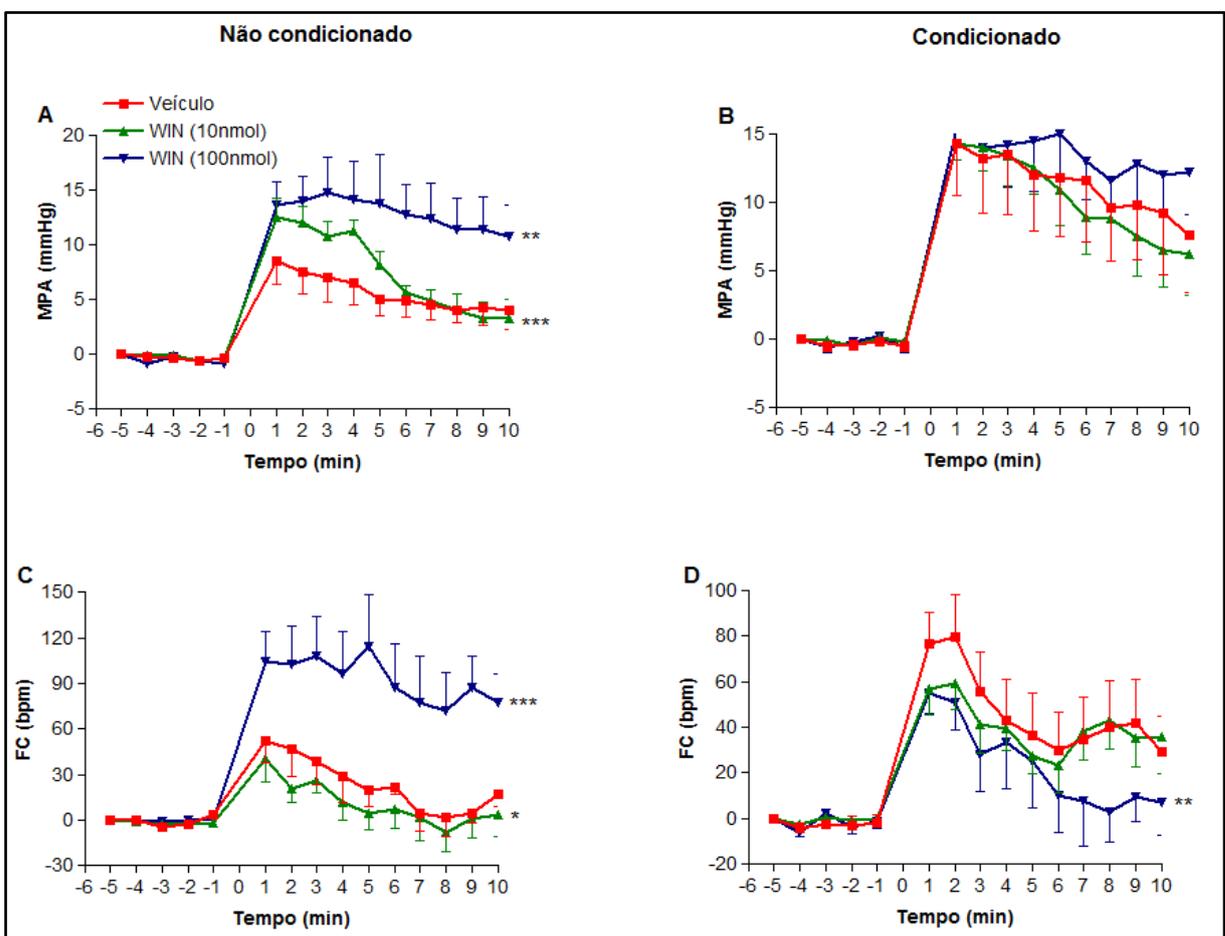


Gráfico 18 - Variação da média da pressão arterial (Δ MPA) e da frequência cardíaca (Δ FC) de descendentes condicionados (A e C, respectivamente) ou não (B e D, respectivamente) ao choque. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparados com filhotes de mães tratadas com veículo. *Two-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Fonte: Da autora.

5 DISCUSSÃO

A avaliação do comportamento materno ao longo dos 21 dias de lactação permitiu a identificação específica dos parâmetros que sofrem maior alteração durante o período. Diversos estudos avaliaram a dinâmica temporal da responsividade materna ao longo do período pós-parto, revelando uma progressiva redução do cuidado materno, a qual está relacionada com as necessidades da prole (GROTA; ADER, 1969, 1974; PEREIRA; SEIP; MORRELL, 2008; FLEMING; ROSENBLATT, 1974; REISBICK; ROSENBLATT; MAYER, 1975; PEREIRA; MORRELL, 2011)

O presente estudo confirmou as pesquisas anteriores e ainda foi possível pontuar os principais comportamentos afetados. Os parâmetros maternos que sofreram maior decaimento ao longo das análises são a cifose, lambida e construção do ninho. Por outro lado, a lactante passa a gastar seu tempo alimentando-se e/ou simplesmente ficando longe dos filhotes, sem explorar o ambiente. Isso ocorre porque os filhotes vão se tornando mais independentes, não necessitando de tanto cuidado (PEREIRA; MORRELL, 2011).

A partir do 14^o dia de lactação foi verificada uma aparente redução na velocidade do ganho de peso da ninhada, o que pode ser decorrente dessa diminuição do comportamento materno, principalmente da cifose, a qual representa a postura mais importante para a nutrição da prole (CALDJI et al., 1998; PEDERSEN; BOCCIA, 2003; PEDERSEN; PRANGE, 1979; BOSCH; NEUMANN, 2011).

5.1 Efeito da infusão contínua de WIN 55,212-2 no comportamento materno exibido por ratas durante a lactação

De uma forma geral, ao longo dos 21 dias de lactação, as ratas tratadas com WIN nas doses de 10 e 100nmol apresentaram diminuição do comportamento materno total, cujos parâmetros mais relevantes foram lambida e cifose.

Consequentemente houve aumento do comportamento não-materno, representado pelo maior tempo despendido pela mãe alimentando a si própria.

Quando foi separada a análise desse comportamento em duas fases – durante e após a infusão da droga – verificou-se que na primeira, o tempo que a mãe passa lambendo os filhotes e alimentando-se são os parâmetros significativos, os quais apresentaram diminuição e aumento, respectivamente. Já na segunda fase, a cifoze passa a ser o parâmetro maternal diminuído e a alimentação própria não apresenta mais diferença significativa entre os grupos. Logo, as diferenças encontradas necessitam de discussões distintas.

A infusão da droga foi realizada constantemente por sete dias. Como as cirurgias para o implante dos “minipumps” foram realizadas no segundo dia de lactação, este foi retirado da análise da primeira etapa já que as ratas estavam se recuperando da anestesia. Assim, a primeira fase que consiste na infusão da droga foi estabelecida correspondendo do 3º ao 9º dia de lactação.

Enquanto o WIN 55,212-2 estava continuamente sendo liberado no ventrículo lateral, foi observada diminuição do comportamento de lambida exibido por essas mães tratadas com a droga quando comparadas com as mães controle. A lambida é um comportamento importante, pois favorece a reposição de água e eletrólitos pela mãe, já que ela ingere parte da urina dos filhotes (GUBERNICK; ALBERTS, 1985). Por outro lado, tal comportamento também objetiva limpar a cria, estimular a defecação e micção dos filhotes (GUBERNICK; ALBERTS, 1983), além de exibir alto impacto no desenvolvimento social e emocional dos mesmos (CALDJI et al., 1998; CHAMPAGNE, 2008; BOSCH; NEUMANN, 2011), o que justifica a posterior análise comportamental – neste trabalho - dos filhotes quando atingem a idade adulta.

A literatura descreve algumas alterações relacionadas com a administração de canabinóides em lactantes. Primeiramente, Tyrey e Murphy (1988) observaram que o canabinóide exógeno Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (THC), injetado via intravenosa, influencia na liberação de ocitocina em resposta à sucção mamilar pelos filhotes, causando transiente suspensão na ejeção de leite.

Com relação à análise comportamental, estudos mostraram que a administração sistêmica aguda e sub-crônica de THC suprimiu o comportamento de construção do ninho, em camundongos (MOSCHOVAKIS et al., 1978; SIEBER et al., 1980). Efeitos similares têm sido reportados em ratas lactantes, nas quais a injeção intravenosa de THC prejudicou todos os componentes do comportamento materno

(BROMLEY et al., 1978; NAVARRO et al., 1995). O prejuízo no comportamento materno também foi observado após administração oral crônica, em camundongos, de um extrato de haxixe (FRISCHKNECHT et al., 1982).

Assim, o presente trabalho encontra-se em consonância com o que já é descrito na literatura, demonstrando que a infusão crônica intracerebroventricular do agonista CB1 (WIN 55,212-2) prejudicou o comportamento materno, especificamente reduzindo o tempo que a mãe permanece lambendo a prole. Apesar do ineditismo, optou-se pela administração central crônica devido à abundante presença de receptores CB1 no cérebro, inclusive em regiões que conhecidamente modulam o comportamento materno. Além de evitar que a droga passasse pelo leite, o que poderia influenciar os filhotes.

Vilela e colaboradores (2013), observaram uma redução da expressão de c-Fos na área pré-óptica medial (mPOA) e *bed* núcleo da estria terminal (BNST) após administração de dexametasona, efeito revertido pelo tratamento com AM251 (antagonista CB1). Além disso, verificou semelhante redução da ativação neuronal administrando WIN 55,212-2 intraperitoneal (VILELA et al., dados não publicados). Então, o efeito da redução de comportamento materno encontrado no presente trabalho pode também estar relacionado à modulação neuroquímica nessas regiões cerebrais citadas, pelo mesmo agonista CB1.

A literatura mostra que, após o parto, lesões provocadas no BNST e na mPOA apresentam diminuição em comportamentos maternos relacionados com a região oral das lactantes, tais como nidificação, lambida ou pegá-los pela boca (NUMAN; NUMAN, 1997; LEE et al., 2000; NUMAN; INSEL, 2003). Além disso, sabe-se que fêmeas pouco lambedoras possuem níveis menores de receptores de ocitocina na mPOA, núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e BNST (FRANCIS CHAMPAGNE; MEANEY, 2000). Assim, é possível sugerir que o agonista administrado tenha atuado principalmente nessas regiões, modulando a liberação de ocitocina, o que culminou na diminuição no comportamento de lambida exibido pelas lactantes tratadas com WIN.

Simultaneamente, foi observado que durante a infusão da droga as lactantes passam mais tempo alimentando-se. Com relação ao achado, é bem consolidado na literatura esse papel orexígeno apresentado pelos canabinóides. O fato de que canabinóides exógenos (maconha e haxixe) são capazes de aumentar a fome e ingestão de comida em humanos, tem sido relatado historicamente e justifica seu

uso visando aumento de apetite a ganho de peso em pacientes com câncer e AIDS, por exemplo (FOLTIN et al., 1986, 1988; MATTES et al., 1994; PLASSE, 1991).

Hoje se sabe que agonistas de receptores CB1 aumentam a ingestão de comida não somente em humanos, mas também em animais (FATTORE et al., 2010). Evidência que pode ser correlacionada com o resultado encontrado neste trabalho, no que diz respeito ao aumento no ganho de peso das lactantes tratadas com WIN, já que essas passam mais tempo se alimentando que as ratas controle.

Direcionando-se agora para a análise da segunda etapa de observações, a qual compreendeu os dias que procedem à infusão da droga, do 10º dia de lactação até o desmame (21º dia de lactação). Esse período foi caracterizado pela permanência na diminuição do comportamento materno, porém a cifose passa a ser o parâmetro diminuído quando administramos a dose de 100nmol e a construção do ninho foi o fator reduzido em lactantes tratadas com dose de 10nmol de WIN. Também observamos o continuado aumento do comportamento não-materno total, contudo não foi possível especificar o parâmetro relacionado.

Após a suspensão da infusão da droga, esperava-se que houvesse a exibição de abstinência. A manifestação da síndrome de retirada tem sido claramente demonstrada, a qual surge após a interrupção de repetidas exposições a canabinóides sintéticos em animais (ACETO; SCATES; MARTIN, 2001), que é o caso desse trabalho.

Dentre os diversos comportamentos exibidos pelos animais após a suspensão na administração da droga estão: tremor na cabeça, pata dianteira e tronco, ataxia, postura arqueada, ptose, piloereção, mastigação, hipolocomoção (CASTAÑÉ; MALDONADO; VALVERDE, 2004) fricção facial, coçar e lambe-se (DIANA et al., 1998), irritabilidade, ansiedade, humor e apetite deprimidos e insônia (BUDNEY et al., 2003, 2004; VANDREY, et al., 2005, 2008).

Assim podemos inferir que, diante do aumento do comportamento não-materno total, as ratas provavelmente estariam realizando algum desses comportamentos relacionados com a síndrome de retirada, os quais não foram detectados especificamente nas análises realizadas. Contudo, a normalização da ingestão alimentar era esperada diante da ausência do canabonóide.

Além disso, a literatura sugere que a retirada, após administração crônica de canabinóides em ratos, está associada com a redução na transmissão dopaminérgica no sistema límbico (DIANA et al., 1998). Sabe-se que a ativação

desse sistema é necessária para a ocorrência do comportamento materno (NUMAN; INSEL, 2003), portanto, essa diminuição de dopamina pode ser outro fator contribuinte para que o comportamento materno permaneça diminuído mesmo após a infusão da droga.

5.2 Consequências da diminuição do comportamento materno em ratas lactantes com relação à avaliação comportamental dos filhotes na vida adulta

Em diversas espécies, a trajetória de desenvolvimento que leva a diferenças individuais pode ser relacionada com experiências precoces vividas (CHAMPAGNE, 2011). Tem sido demonstrado que variações na lambida recebida pelos filhotes afetam profundamente circuitos neurais que regulam respostas endócrinas e comportamentais dos filhotes quando na vida adulta (RUTHSCHILLING et al., 2012). Por isso foram avaliadas algumas alterações na prole de mães tratadas com WIN, as quais apresentaram deficiência no cuidado materno, especificamente redução na lambida e cifose.

No teste de campo aberto, foi observado que, tanto em fêmeas quanto em machos, houve aumento no número de entradas no centro e número de *rearing* (exploração vertical). Contudo, o número total de entradas, que indica atividade exploratória, e o efeito anti-tigmotático, que fornece o grau de comportamento relacionado com ansiedade, não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Utilizando-se o mesmo aparato de campo aberto, foram comparados filhotes de mães classificadas como *high licking* (classificação dada às mães que lambem mais a prole) e *low licking*. O resultado encontrado foi um aumento da atividade exploratória dos filhotes que receberam mais lambida, comportamento correlacionado com diminuição de ansiedade/medo (CALDJI et al., 1998; URIARTE, et al., 2007; BEERY; FRANCIS, 2011). Essa mesma alteração de comportamento foi exibida por filhotes que passaram pelo *handling* (manipulação) neonatal, procedimento que envolve separação maternal repetida e breve, seguida de manipulação experimental (SEVERINO et al., 2004; TODESCHIN et al., 2009).

Outro teste utilizado para avaliar respostas relacionadas à ansiedade é o labirinto em cruz elevado (PELLOW et al., 1985; MARCO et al., 2009). Filhotes que sofreram privação maternal prolongada, experiência precoce que prejudica a interação entre mãe e filhote (LEVINE, 2000; MEANEY, 2001; MARCO et al., 2009), apresentaram redução no número de *rearing* e da atividade locomotora geral (LIORENTE et al., 2007; MARCO et al., 2009). Porém, no presente trabalho, mesmo recebendo menos cuidado materno, os filhotes de mães tratadas com WIN submetidos a este teste não apresentaram diferença significativa em nenhum parâmetro analisado.

Por outro lado, com relação ao teste comportamental de medo condicionado ao contexto, os resultados exibidos estão de acordo com a literatura. Mesmo sem receberem choque no dia anterior, os filhotes machos, que receberam menos cuidado materno no período pós-parto, apresentaram diminuição na latência para exibir o primeiro *freezing*. Pode-se considerar que esses animais apresentaram elevação do medo inato, uma vez que não receberam o estímulo aversivo anteriormente (condicionamento) (MILLAN, 2003; LISBOA et al., 2010).

É descrito na literatura que filhotes de mães que exibem diminuição no tempo de lambida – *low licking* - quando adultos, apresentam aumento do medo em resposta a um ambiente novo no *shock-probe burying test* quando comparados com a prole de mães *high licking* (MENARD, CHAMPAGNE e MEANEY, 2004). Alteração oposta foi observada na prole adulta que passou pelo denominado *handling* (manipulação) neonatal (ARBORELIUS; ENKLUND, 2007; CALDJI et al., 2000; LEVINE et al., 1967; TODESCHIN et al., 2009).

Assim, é importante notar o grau de similaridade entre os efeitos na prole que sofreu a manipulação neonatal e na prole de mães HL (CALDJI et al., 1998). A semelhança com relação à diminuição do medo e ansiedade em ambos os casos, pode ser explicada devido ao fato de que mães submetidas ao *handling* neonatal apresentam maior frequência na lambida, equiparando-se às mães HL (LEE; WILLIAMS, 1974; LIU et al., 1997; CALDJI et al., 1998). Diante disso, o aumento da resposta ao medo observado no presente trabalho pode ser atribuído ao menor tempo gasto, pelas mães tratadas com WIN, lambendo os filhotes.

A influência da diminuição do cuidado materno na expressão do medo em filhotes parece ser mediada por alterações de receptores em regiões cerebrais relacionadas com a regulação do medo (MENARD; CHAMPAGNE; MEANEY, 2004).

Filhotes de mães LL – que exibem elevação do medo – apresentaram, por exemplo, aumento de receptores CRF no locus coeruleus, bem como diminuição nos níveis dos receptores GABA_A e benzodiazepínicos no núcleo central e basolateral da amígdala (CALDJI et al., 1998). Esse perfil de alteração é condizente com o papel de cada receptor e região na modulação do medo, no caso, aumento desse comportamento (BUTLER et al., 1990; MENARD; TREIT, 1999; MENARD; CHAMPAGNE; MEANEY, 2004)

Assim, pode-se correlacionar que a diminuição da lambida exibida tanto pelas mães tratadas com WIN, quanto por mães LL descritas na literatura são capazes de provocar elevação no comportamento de medo exibido pelos machos quando atingem a idade adulta. Por outro lado, o comportamento de *freezing* exibido pelas fêmeas praticamente não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

Sabe-se que a elevação no comportamento de *freezing*, refletindo aumento do medo condicionado ao contexto, é associada à ativação do sistema nervoso autônomo (MCCARTY; KOPIN, 1978; CARRIVE, 2002; HOTT et al., 2012). Então, foram avaliadas essas alterações através das medidas de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC).

Mesmo não apresentando alterações no teste comportamental, observou-se que as fêmeas que não receberam choque nas patas apresentaram elevação tanto na PA quanto na FC (somente nas provenientes de mães tratadas na dose de 100nmol).

Uma explicação para os resultados encontrados nas fêmeas seria que a diminuição no tempo de lambida afeta mais os machos que as fêmeas, uma vez que elas naturalmente recebem menos lambida que os machos (MOORE, 1995; MOORE; MORELLI, 1979; MOORE; POWER, 1986; CHAMPAGNE et al., 2003). Diversos estudos mostram diferenças entre os gêneros com relação a aspectos emocionais, nos quais fêmeas exibem menor intensidade nos comportamentos relacionados ao medo e ansiedade que os machos (FERNANDES et al., 1999. JOHNSTON; FILE, 1991; STEENBERGEN et al., 1989; URIARTE et al., 2007).

Outro ponto a ser levado em consideração, o qual pode ter impedido a detecção das alterações de medo e ansiedade nas fêmeas, é que não foi identificado previamente em qual fase do ciclo estral encontravam-se as fêmeas. Esse fator pode ter influenciado os resultados, já que alguns testes comportamentais

emocionais apresentam diferenças dependendo da fase do ciclo em que a rata se encontra (SEVERINO et al., 2004).

Com relação aos machos, foi observado que filhotes, não condicionados ao estímulo, de mães tratadas com WIN na dose de 10nmol apresentaram diminuição tanto da PA quanto da FC. Sabe-se que animais que permanecem mais tempo em *freezing*, como é o caso, apresentam diminuição da atividade locomotora (HOTT et al., 2012). Essa atividade motora está positivamente correlacionada com a variação na PA e FC, de modo que uma maior atividade locomotora leva a uma maior resposta cardiovascular (YANCEY; OVERTON, 1993; NIJSEN et al., 1998; HOTT et al, 2012). Assim, a diminuição dos parâmetros cardiovasculares encontrada pode ser atribuída ao maior tempo que os filhotes permaneceram imóveis.

6 CONCLUSÃO

O agonista de receptor CB1 (WIN 55,212-2) quando infundido cronicamente i.c.v. diminui o comportamento materno de ratas lactantes, principalmente a lambida, além de aumentar o tempo que a mãe passa se alimentando. Esse efeito reflete nos filhotes quando na fase adulta, gerando principalmente aumento na resposta ao medo em machos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACETO, M. D.; SCATES, S. M.; MARTIN, B. B. Spontaneous and precipitated withdrawal with a synthetic cannabinoid, WIN 55,212-2. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 416, p. 75-81, 2001.

AGID, O. et al. Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. **Mol. Psychiatry**, v. 4, p. 163-172, 1999.

AKERS, K. G.; REEBA, B. C.; TANG, A. C. Developmentally stable sex-dependent modulation of turning asymmetry by neonatal novelty exposure. **Behav. Brain Res.**, v. 155, p. 257-263, 2004.

AKIRAV, I. The role of cannabinoids in modulating emotional and non-emotional memory process in the hippocampus. **Front. Behav. Neurosci.**, v. 5, p. 34, 2011.

ARBORELIUS, L.; ENKLUND, M. B. Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle aged female rats. **Neuroscience**, v. 145, p. 738-750, 2007.

ATSAK, P.; ROOZENDAAL, B.; CAMPOLONGO, P. Role of the endocannabinoid system in regulating glucocorticoid effects on memory for emotional experiences. **Neuroscience**, v. 204, p. 104-116, 2012.

BAKOWSKA, J. C.; MORRELL, J. I. Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 386, p. 161-177, 1997.

BAYEWITCH, M. et al. (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 9902-9905, 1996.

BEERY, A. K.; FRANCIS, D. D. Adaptive significance of natural variations in maternal care in rats: a translational perspective. **Neuroscience and Biobehavioral reviews**, v.35, p.1552-1561, 2011.

BENITO, C. et al. Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 153, p. 277-285, 2008.

BOSCH, O. J.; NEUMANN, I. D. Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: from central release to sites of action. **Horm. Behav.**, v. 61, n. 3, p. 293-303, 2011.

BREIER, A. et al. Early parental loss and development of adult psychopathology. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.45, p.987-993, 1988.

BRIDGES, R. S. Quantitative analysis of the roles of dosage, sequence, and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat. **Endocrinology**, v. 114, p. 930-940, 1984.

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

BRIDGES, R. S. et al. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 20, p. 8003-8007, 1990.

BROMLEY, B. L. et al. Delta-9-tetrahydrocannabinol inhibition of suckling-induced prolactin release in the lactating rat. **Endocr. Res. Commun.**, v. 5, p. 271-278, 1978.

BUDNEY, A. J. et al. Review of the validity and significance of cannabis withdrawal syndrome. **American journal of Psychiatry**, v. 161, p. 1967-1977, 2004.

BUDNEY, A. J. et al. The time course and significance of cannabis withdrawal. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 112, p. 393-402, 2003.

BUTLER, P. D. et al. Corticotropin-releasing factor produces fear-enhancing and behavioral activating effects following infusion into the locus coeruleus. **J. Neurosci.**, v. 10, p. 176-183, 1990.

CALDJI, C. et al. The effect of early rearing environment on the development of GABA_A and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, p. 219-229, 2000.

CALDJI, C. et al. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 5335-5340, 1998.

CAMERON, N. et al. Maternal programming of sexual behavior and hypothalamic–pituitary–gonadal function in the female rat. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5,, 2008.

CAMERON, N. M. et al. The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 843-865, 2005.

CAMPOLONGO, P. et al. The endocannabinoid transport inhibition AM404 differentially modulates recognition memory in rats depending on environmental aversiveness. **Front. Behav. Neurosci.**, v. 6, p. 11, 2012.

CAMPOLONGO, P. et al. Fat-induced satiety factor oleoylethanolamide enhances memory consolidation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 106, p. 8027-8031, 2009a.

CAMPOLONGO, P. et al. Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 106, p. 4888-4893, 2009b.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 29, n. 8, p. 1193-205, 2005.

CARRIVE P. Cardiovascular and behavioural components of conditioned fear to context after ganglionic and alpha-adrenergic blockade. **Auton. Neurosci.**, v. 98, p. 90-93, 2002.

CASTAÑÉ, A.; MALDONADO, R.; VALVERDE, O. Role of different brain structures in the behavioural expression of WIN 55,212-2 withdrawal in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 1309-1317, 2004.

CHAMPAGNE, F. A. Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 29, n. 3, p. 386-97, 2008.

CHAMPAGNE, F. et al. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 98, p. 12736-12741, 2001.

CHAMPAGNE, F. A. Maternal imprints and the origins of variation. **Hormones and Behavior**, v. 60, p. 4-11, 2011.

CHAMPAGNE, F. A. Maternal influence on offspring reproductive behavior: implications for transgenerational effects. R.S. Bridges (Ed.), *Neurobiology of the Parental Brain*, Academic Press, San Diego, p. 307-318, 2008.

CHAMPAGNE, F. A. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiol. Behav.**, v. 79, p. 359-371, 2003.

CIRULLI, F.; BERRY, A.; ALLEVA, E. Early disruption of the mother-infant relationship: Effects on brain plasticity and implications for psychopathology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 1-2, p. 73-82, 2003.

COTA, D. et al. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. **J. Clin. Invest.**, v. 112, p. 423-431, 2003.

DEVANE, W. A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-1949, 1992.

DI MARZO, V. A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 27, p. 134-140, 2006.

DI MARZO, V.; PETROCELLIS, L. D. Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. **Annu. Rev. Med.**, v. 57, p. 553-574, 2006.

DIANA, M. et al. Mesolimbic dopaminergic decline after cannabinoid withdrawal. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 95, p. 10269-10273, 1998.

DONG, H. W.; SWANSON, L. W. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, anteromedial area: cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and behavioral aspects of energy balance. **J. Comp. Neurol.**, v. 494, p. 142-178, 2006a.

DONG, H. W.; SWANSON, L. W. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, magnocellular nucleus: implications for cerebral hemisphere regulation of micturition, defecation, and penile erection. **J. Comp. Neurol.**, v. 494, p. 108-141, 2006b.

FATTORE, L. et al. The endocannabinoid system and nondrug rewarding behaviours. **Experimental Neurology.**, v. 224, p. 23-36, 2010.

FERNANDES, C. et al. Factor analysis shows that female rat behaviour is characterized primarily by activity, male rats are driven by sex and anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 64, n. 4, p. 731–738, 1999.

FERREIRA, A. et al. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. **Physiology Behavioral**, v. 77, p. 197-204, 2002.

FILE, S. E. New strategies in the search for anxiolytics. **Drug Des. Deliv.**, v. 5, n. 3, p. 195-201, 1990.

FLEMING, A. S.; LUEBKE, C. Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: Emotionally differences between nulliparous and parturient females. **Physiology and Behavior**, v. 27, n. 5, p. 863-868, 1981.

FLEMING, A. S.; ROSENBLATT, J. S. Maternal behavior in the virgin and lactating rat. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 86 p. 957-972, 1974.

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

FOLTIN, R. W.; BRADY, J. V.; FISCHMAN, M. W. Behavioral analysis of marijuana effects on food intake in humans. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 25, p. 577-582, 1986.

FOLTIN, R. W.; FISCHMAN, M. W.; BYRNE, M. F. Effects of smokes marijuana in food intake and body weight of humans living in a residential laboratory. **Appetite**, v. 11, p. 1-14, 1988.

FRAGA, M.C. et al. Maternal prolactin inhibition at the end of lactation affects learning/memory and anxiety-like behaviors but not novelty-seeking in adult rat progeny. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 100, n. 1, p. 165-73, 2011.

FRAGA-MARQUES, M. C. et al. Effects of maternal hyperleptinaemia during lactation on short-term memory/learning, anxiety-like and novelty-seeking behavioral traits of adult male rats. **Behav. Brain Res.**, v. 206, n. 1, p. 147-50, 2010.

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

FRANCIS, D. et al. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. **Science**, v. 286, p. 1155-1158, 1999.

FREUND, T. F.; KATONA, I.; PIOMELLI, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signalling. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 1017-1066, 2003.

FREUND-MERCIER, M.J. et al. Pharmacological characteristics and anatomical distribution of [3H]oxytocin-binding sites in the Wistar rat brain studied by autoradiography. **Neuroscience**, v. 20, p. 599-614, 1987.

FRISCHKNECHT, H. R.; SIEBER, B.; WASER, P. G. Effects of multiple, chronic and early hashish exposure on mating behavior, nest-building and gestation in mice. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 72, p. 363-368, 1982.

GAONI, Y.; MECBONLAM, R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 86, p. 1646-1647, 1964

GEORGES, F.; ASTON-JONES, G. Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: a novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 5173-5187, 2002.

GOMES, C. M. et al. Neonatal handling and reproductive function in female rats. **J. Endocrinol.**, v. 184, p. 435-445, 2005.

GOMES, F. V. et al. Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT_{1A} receptors. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 104-113, 2010.

GOODWIN, R. D.; STEIN, M. B. Association between childhood trauma and physical disorders among adults in the United States. **Psychol. Med.**, v. 34, n. 3, p. 509-520, 2004.

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

GROTA, I. J.; ADER, R. Continuous recording of maternal behavior in *Rattus norvegicus*. **Animal Behavior**, v. 17, p. 722-729, 1969.

GRUETER, B.A. et al. Extracellular-signal regulated kinase 1-dependent metabotropic glutamate receptor 5-induced long-term depression in the bed nucleus of the stria terminalis is disrupted by cocaine administration. **J. Neurosci.**, v. 26, p. 3210-3219, 2006.

GUBERNICK, D. J.; ALBERTS, J. R. Maternal licking of young: resource exchange and proximate controls. **Physiol. Behav.**, v. 31, p. 593-601, 1983.

GUBERNICK, D. J.; KLOPFER, P. H. Parental care in mammals. **Plenum Press**, New York, 1981.

GUBERNICK, D. J.; ALBERTS, J. R. Maternal licking by virgin and lactating rats: water transfer from pups. **Physiology & Behavior**, v. 34, p. 501-506, 1985.

HANCOCK, S. D.; MENARD, J. L.; OLMSTED, M. C. Variations in maternal care influence vulnerability to stress-induced binge eating in female rats. **Physiol. Behav.**, v. 85, p. 430-439, 2005.

- HILL, M. N. et al. Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 107, p. 9406-9411, 2009.
- HILLARD, C. J. Endocannabinoids and vascular function. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 294, p. 27-32, 2000.
- HOUSHAM, S. J.; TERENZI, M. G.; INGRAM, C. D. Changing pattern of oxytocin-induced excitation of neurons in the bed nuclei of the stria terminalis and ventrolateral septum in the peripartum period. **Neuroscience**, v. 81, n. 2, p. 479-88, 1997.
- HOWLETT, A. C.; FLEMING, R. M. Cannabinoid inhibition of adenylatecyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. **Mol. Pharmacol.**, v. 26, p. 532-538, 1984.
- HUNTINGFORD, F. A. Animals fight but do not make war. In: Groevel, J.; Hinde, R. A. Aggression and war – their biological and social bases. **Cambridge University Press**, 1989.
- INSEL, T. R. Postpartum increases in brain oxytocin binding. **Neuroendocrinology**, v. 44, p. 515-518, 1986
- INSEL, T. R. Regional changes in brain oxytocin receptors postpartum: time-course and relationship to maternal behaviour. **J. Neuroendocrinol.**, v. 2, p. 539-546. 1990.
- JACOBSON, C. D. et al. Effects of small medial preoptic area lesions on maternal behavior: retrieving and nest building in the rat. **Brain Res.**, v. 194, p. 471-478, 1980.
- JANS, J. E.; LEON, M. Determinates of mother Young contact in Norway rats. **Physiology & Behavior**, v. 30, p. 919-935, 1983.
- JOHNSTON, A. L.; FILE, S. E. Sex difference in animal tests of anxiety. **Physiology and Behavior**, v. 49, n. 2, p. 245-250, 1991.
- KAFFMAN, A.; MEANEY, M. J. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. **J. Child Psychol. Psychiatry**, v. 48, n. 3-4, p. 224-44, 2007.
- KOGAN, N. M.; MECHOULAM, R. The chemistry of endocannabinoids. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 29, p. 3-14, 2006.
- KOSTEN, T. A.; LEE, H. J.; KIM, J. J. Neonatal handling alters learning in adult male and female rats in a task-specific manner. **Brain Res.**, v. 1154, p. 144-153, 2007.
- LABAN, O. et al. Maternal deprivation and early weaning modulate experimental allergic encephalomyelitis. **Brain Behav. Immunol.**, v. 9, p. 9-19. 1995
- LAZARATOU, H. et al. The pharmacological effects of fractions obtained by smoking cannabis through a water-pipe. A second fractionation step. **Experientia**, v. 36, p. 1407-1408, 1980.

- LEE, A.; CLANCY, S.; FLEMING, A. S. Mother rats bar-press for pups: effects of lesions of the mPOA and limbic sites on maternal behavior and operant responding for pup-reinforcement. **Behav. Brain. Res.**, v. 108, p. 215-231, 2000.
- LEE, M. H. S.; WILLIAMS, D. I. Changes in licking behaviour of rat mother following handling of young. **Animal Behaviour**, v. 22, p. 679, 1974.
- LEE, R. et al. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: reversal by oxytocin. **Brain Res.**, v. 1156, p. 152-167, 2007.
- LENZ, K. M.; SENNELAUB, D. R. Maternal care effects on SNB motoneuron development: the mediating role of sensory afferent distribution and activity. **Dev. Neurobiol.**, v. 69, n. 9, p. 603-615, 2009.
- LEVINE, S. Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, n. 1-3, p. 149-160, 2000.
- LEVINE, S. Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. **Science**, v. 135, p. 795-799, 1962.
- LEVINE, S. et al. Physiological and behavioral effects in infantile stimulation. **Physiol. Behav.**, v. 2, p. 55-59, 1967.
- LEWEKE, F. M. et al. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. **Transl. Psychiatry**, v. 94, 2012.
- LIM, M.; YOUNG, L. J. Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. **Horm. Behav.**, v. 50, p. 506-517, 2006.
- LIORANTE, R. et al. Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induced long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, p. 636-650, 2007.
- LISBOA, S. F. et al. Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. **Neuroscience**, v. 171, p. 760-768, 2010.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.
- LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v. 277, p. 1659-1662, 1997.
- LONSTEIN, J. S.; SIMMONS, D. A.; STERN, J. M. Functions of caudal periaqueductal gray in lactating rats: kyphosis, lordosis, maternal aggression, and fearfulness. **Behav. Neurosci.**, v. 112, p. 1502-1518, 1998.
- LONSTEIN, J. S.; WAGNER, C. K.; DE VRIES, G. J. Comparison of the nursing and other parental behaviors of nulliparous and lactating female rats. **Hormones and Behavior**, v. 36, p. 242-251, 1999.

LUTZ, B. Endocannabinoid signals in the control of emotion. **Curr. Opin.Pharmacol.**, v. 9, p. 46-52, 2009.

MANDUCA, A.; CAMPOLONGO, P.; TREZZA, V. Cannabinoid modulation of mother-infant interaction: is it just about milk?.**Rev. Neurosci.**, 2012, *In Press*.

MANN, P. E. Finasteride delays the onset of maternal behavior in primigravid rats. **Physiology Behavior**, v. 88, p. 333-338, 2006.

MARCO, E. M. et al. Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, p. 498-507, 2009.

MARCO, E. M. et al. Endocannabinoid system and psychiatry: in search of a neubiological basis for detrimental and potential therapeutic effects. **Front. Behav.Neosci.**, v. 5, p. 63, 2011.

MARCO, E.M.; LAVIOLA, G. The endocannabinoid system in the regulation of emotions throughout lifespan: a discussion on therapeutic perspectives. **J. Psychopharmacol.**, v. 26, p. 150-163, 2012.

MASHOODH, R. et al. Paternal social enrichment effects on maternal behavior and offspring growth. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 109, p. 17232-17238, 2012.

MASSI, L. et al. Cannabinoid receptors in the bed nucleus of the stria terminalis control cortical excitation of midbrain dopamine cells *in vivo*. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 42, p. 10496-10508, 2008.

MATSUDA, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, p. 561-564, 1990.

MATTES, R. D. et al. Cannabinoids and appetite stimulation. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 49, p. 187-195, 1994.

MAYER, A. D.; ROSENBLATT, J. S. Hormonal factors influence the onset of maternal aggression in laboratory rats. **Hormonal Behavior**, v. 21, p. 253-267, 1987.

MCCARTY, R.; KOPIN, I. J. Alterations in plasma catecholamines and behavior during acute stress in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. **Life Sci**, v. 22, p. 997-1005, 1978.

MCELLIGOTT, Z. A.; WINDER, D. G. Modulation of glutamatergic synaptic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.**, v. 33, p. 1329-1335, 2009.

MEANEY, M. J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Anna. Rev. Neurosci.**, v. 24, p. 1161-1192, 2001.

MEANEY, M.J. et al. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. **Science**, v. 239, p. 766-768, 1988.

- MEERLO, P. et al. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. **J. Neuroendocrinol.**, v. 11, p. 925-933, 1999.
- MENARD, J.; TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neurosci. Behav. Rev.**, v. 23, p. 591-613, 1999.
- MENARD, J. L.; CHAMPAGNE, D. L.; MEANEY, M. J. P. Variations of maternal care differentially influence "fear" reactivity and regional patterns of c-Fos immunoreactivity in response to the shock-probe burying test. **Neuroscience**, v. 129, p. 297-308, 2004.
- MILLAN, M.J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog. Neurobiol.**, v. 70, p. 83-244, 2003.
- MIRANDA-PAIVA, C.M. et al. A role for the periaqueductal grey in opioidergic inhibition of maternal behavior. **Eur. J. Neurosci.**, v. 18, n. 3, p. 667-674, 2003.
- MOLDRICH, G.; WENGER, T. Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. **Peptides**, v. 21, p. 1735-1742, 2000.
- MOORE, C. L. The role of maternal stimulation in the development of sexual behavior and its neural basis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 662, p. 160-177, 1992.
- MOORE, C. L. Maternal contributions to mammalian reproductive development and the divergence of males and females. **Adv. Study Behav.**, v. 24, p. 47-118, 1995.
- MOORE, C. L. Maternal contributions to the development of masculine sexual behavior in laboratory rats. **Dev. Psychobiol.**, v. 17, n. 4, p. 347-356, 1984.
- MOORE, C. L. Sex differences in urinary odors produced by Young laboratory rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 99, n. 3, p. 336-341, 1985.
- MOORE, C. L.; MORELLI, G. A. Mother rats interact differently with male and female offspring. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 93, p. 677-684, 1979.
- MOORE, C. L.; POWER, K. L. Prenatal stress affects mother-infant interaction in Norway rats. **Dev. Psychobiol.**, v. 19, p. 235-245, 1986.
- MOREIRA, F. A.; LUTZ, B. The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. **Addict. Biol.**, v. 13, p. 196-212, 2008.
- MOSCHOVAKIS, A. et al. Cannabis interferes with nest-building behavior in mice. **Psychopharmacology**, v. 58, p. 181-183, 1978.
- MUNRO, S. THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoid. **Nature**, v. 365, n. 644, p. 61-65, 1993.
- NAVARRO, M.; RUBIO, P.; RODRIGUEZ DE FONSECA, F. Behavioural consequences of maternal exposure to natural cannabinoids in rats. **Psychopharmacology**, v. 122, p. 1-14, 1995.

- NIJSEN, M.J. et al. Conditioned fear-induced tachycardia in the rat: vagal involvement. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 350, p. 211-222, 1998.
- NUMAN, M. Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness towards infants. **Behavioral and Cognitive Neuroscience Review**, v. 5, n. 4, p. 163-190, 2006.
- NUMAN, M. A neural circuitry analysis of maternal behavior in the rat. **Acta Paediatrica Supplement**, v. 397, p. 19-28, 1994.
- NUMAN, M.; FLEMING, A. S.; LEVY, F. Maternal Behavior. In J. D. Neill (Ed.), Knobil and Neill's physiology of reproduction. New York: Elsevier, p. 1921-1993, 2006.
- NUMAN, M.; INSEL, T. R. The neurobiology of parental behavior. **Springer-Verlag**, New York, 2003.
- NUMAN, M.; NUMAN, M. J. Projection sites of medial preoptic area and ventral bed nucleus of the stria terminalis neurons that express Fos during maternal behavior in female rats. **J. Neuroendocrinol.**, v. 9, p. 369-384, 1997.
- NUMAN, M.; ROSENBLATT, J. S.; KOMISARUK, B. R. Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 91, n. 1, p. 146-64, 1977.
- NUMAN, M.; SMITH, H. G. Maternal behavior in rats: evidence for the involvement of preoptic projections to the ventral tegmental area. **Behavioral Neuroscience**, v. 98, p. 712-727, 1984.
- NUMAN, M.; STOLZENBERG, D. S. Medial preoptic area interactions with dopamine neural system in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 1, p. 46-64, 2009.
- NUMAN, M. et al. Temporary inactivation of ventral tegmental area neurons with either muscimol or baclofen reversibly disrupts maternal behavior in rats through different underlying mechanisms. **Behavioral Neuroscience**, v. 123, n. 4, p. 740-751, 2009.
- NUMAN, M.; WOODSIDE, B. Maternity: Neural Mechanisms, Motivational Processes, and Physiological Adaptations. **Behavioral Neuroscience**, v. 124, n. 6, p. 715-741, 2010.
- PADOIN, M.J. et al. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. **Behav. Neurosci.**, v. 115, p. 1332-1340, 2001.
- PAMPLONA, F.; TAKAHASHI, R. Psychopharmacology of the endocannabinoids: far beyond anandamide. **J. Psychopharmacol.**, v. 26, p. 7-22, 2012.
- PARENT, C. I.; MEANEY, M. J. The influence of natural variations of maternal care on play fighting in the rat. **Dev. Psychobiol.**, v. 50, n. 8, p. 767-776, 2008.
- PAROLARO, D. Presence and functional regulation of cannabinoid receptors in immune cells. **Life Sci.**, v. 65, p. 637-644, 1999.

PATON, W. D. Pharmacology of marijuana. **Annu. Rev. Pharmacol.**, v. 15, p. 191-220, 1975.

PECHTEL, P.; PIZZAGALLI, D. A. Effects of early life stress on cognitive and affective function: an integrated review of human literature. **Psychopharmacology**, v. 214, p. 55-70, 2011.

PEDERSEN, C. A.; BOCCIA, M. L. Oxytocin antagonism alters rat dams' oral grooming and upright posturing over pups. **Physiol. Behav.**, v. 80, p. 233-241. 2003.

PEDERSEN, C.A. et al. Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental and medial preoptic areas. **Behavioral Neuroscience**, v. 108, n. 6, p. 1163-1171, 1994.

PEDERSEN, C. A.; PRANGE Jr, A. J. Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 76, p. 6661-6665. 1979.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries en an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PEREIRA, M.; MORRELL, J. I. Functional mapping of the neural circuitry of rat maternal motivation: effects of site-specific transient neural inactivation. **J. Neuroendocrinol.**, v. 23, n. 11, p. 1020-1035, 2011.

PEREIRA, M.; SEIP, K. M.; MORRELL, J. I. Maternal motivation and its neural substrate across the postpartum period. In: Bridges, ed. *The Neurobiology of the Parental Mind*. San Diego: Elsevier Academic Press, p.39-59, 2008.

PEREIRA, M.; MORRELL, J. I. The changing role of the medial preoptic area in the regulation of maternal behavior across the postpartum period: facilitation followed by inhibition. **Behav. Brain Res.**, v. 205, n. 1, p. 238-248, 2009.

PFAFF, D.; KEINER, M. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 151, p. 121-158, 1973.

PFAFF, D. W. Motivational concepts: Definitions and distinctions. In D.W. Pfaff (ed.) *The psychological mechanisms of motivation*. **Springer-Verlag**, New York, p. 3-24, 1982.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signaling. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 4, p. 873-884, 2003.

PLASSE, T. F. Clinical use of dronabinol. **J. Clin. Oncol.**, v .9, p. 2079-2080, 1991.

POLAN, H. J.; HOFER, M. A. Maternally Directed Orienting Behaviors of Newborn Rats. **Developmental Psychobiology**, v. 34, n. 4, p. 269-279, 1999.

PRYCE, C. R. et al. Comparison of the effects of infant handling, isolation, and nonhandling on acoustic startle, prepulse inhibition, locomotion, and HPA activity in the adult rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 115, n. 1, p. 71-83, 2001.

RAINEKI, C. et al. Effects of neonatal handling on central noradrenergic and nitric oxidergic systems and reproductive parameters in female rats.

Neuroendocrinology, v. 87, p. 151-159, 2008.

REISBICK, S.; ROSENBLATT, J. S.; MAYER, A. D. Decline of maternal behavior in the virgin and lactating rat. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 89, p. 722-732, 1975.

RHEE, M.H. et al. Cannabinol derivatives: binding to cannabinoid receptors and inhibition of adenylyl cyclase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 3228-3233, 1997.

RIEBE, C. J.; WOTJAK, C. T. Endocannabinoids and stress. **Stress**, v. 14, p. 384-397, 2011.

ROCK, E.M. et al. Cannabidiol, a non-psychoactive component of cannabis, attenuates vomiting and nausea-like behavior via indirect agonism of 5-HT(1A) somatodendritic autoreceptors in the dorsal raphe nucleus. **Br. J. Pharmacol.**, v. 165, p. 2620-2634, 2012.

ROSENBLATT, J. S. Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. **Science**, v. 156, p. 1512-1514, 1967.

ROSENBLATT, J. S.; MAYER, A. D. An analysis of approach/withdrawal process in the initiation of maternal behavior in the laboratory rat. In Hood, K. E.; Greenberg, G.; Tobach, E. (ed.). **Behavioral development**, p. 177-230, 1995.

ROTS, N.Y. et al. Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. **J. Neuroendocrinol.**, v. 8, n. 7, p. 501-506, 1996.

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

RUBINO, T.; PAROLARO, D. Long lasting consequences of cannabis exposure in adolescence. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 286, p. S108-113, 2008.

RUSSO, E. Cannabis in India: ancient lore and modern medicine. In: Cannabinoids as therapeutics. R. Mechoulam, ed. (Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag). p. 1-22, 2005.

RUSSO, E.B. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. **Chem. Biodivers.**, v. 4, p. 1614-1648, 2007.

RUTHSCHILLING, C.A. et al. Analysis of transcriptional levels of the oxytocin receptor in different areas of the central nervous system and behaviors in high and low licking rats. **Behavioural Brain Research.**, v. 228, p. 176-184, 2012.

SCHECHTER, M. et al. Blocking the postpartum mouse dam's CB1 receptors impairs maternal behavior as well as offspring development and their adult social-emotion behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 226, p. 481-492, 2012.

SCHLICKER, E.; KATHMANN, M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 22, p. 565-572, 2001.

SEVERINO, G.S. et al. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. **Physiology & Behavior**, v. 81, p. 489-498, 2004.

SHEEHAN, T.P. et al. Using c-Fos immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. **Behav. Neurosci.**, v. 114, p. 337-352, 2000.

SIEBER, B.; FRISCHKNECHT, H. R.; WASER, P. G. Behavioral effects of hashish in mice. I. Social interactions and nest-building behavior of males. **Psychopharmacology**, v. 70, p. 149-154, 1980.

SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tracttracing study in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 270, p. 209-242, 1988.

SLATTERY, D. A; NEUMANN, I. D. No stress please! Mechanisms of stress hyporesponsiveness of the maternal brain. **J. Physiol.**, v. 586, n. 2, p. 377-385, 2008.

SMITH, C. D. et al. Effects of noradrenergic alpha-2 receptor antagonism or noradrenergic lesions in the ventral bed nucleus of the stria terminalis and medial preoptic area on maternal care in female rats. **Psychopharmacology**, v. 224, p. 262-276, 2012.

STAMATAKIS, A. et al. Effect of neonatal handling on adult rat spatial learning and memory following acute stress. **Stress**, v. 11, p. 148-159, 2008.

STEENBERGEN, H. L. et al. Sex-dependent effects of inescapable shock administration on behavior and subsequent escape performance in rats. **Physiology and Behavior**, v. 45, n. 4, p. 781-787, 1989.

STEFFENS, M. et al. Cannabinoid CB1 receptor-mediated modulation of evoked dopamine release and of adenylyl cyclase activity in the human neocortex. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, p. 1193-203, 2004.

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

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. **Physiol. Behav**, v. 47, p. 993-1011, 1990.

TABER, K. H.; HURLEY, R. A. Endocannabinoids: stress, anxiety, and fear. **J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.**, v. 21, n. 4, p. 109-113, 2009.

TERZIAN, A.L. et al. The dopamine and cannabinoid interaction in the modulation of emotions and cognition: assessing the role of cannabinoid CB1receptor in neurons expressing dopamine D1 receptors. **Front. Behav. Neurosci.**, v. 5, p. 49, 2011.

TODESCHIN, A.S. Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. **Horm. Behav.**, v. 56, n. 1, p. 93-100, 2009.

TOUWN, M. The religious and medicinal uses of cannabis in China, India and Tibet. **J. Psychoactive Drugs**, v. 13, p. 23-24, 1981.

TSOU, K. et al. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. **Neuroscience**, v. 83, n. 2, p. 393-411, 1998.

TYREY, L.; MURPHY, L. L. Inhibition of suckling-induced milk ejections in the lactating rat by delta 9-tetrahydrocannabinol. **Endocrinology**, v. 123, n. 1, p. 469-472, 1988.

URIARTE, N. et al. Effects of maternal care on the development, emotionality, and reproductive functions in male and female rats. **Developmental Psychobiology**, v. 49, p. 451-462, 2007.

VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. **Am. J. Psychol.**, v. 83, n. 1, p. 103-111, 1970.

VALLÉE, M. et al. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. **J. Neurosci.**, v. 17, n. 7, p. 2626-2636, 1997.

VANDREY, R. G. A within-subject comparison of withdrawal symptoms during abstinence from cannabis, tobacco, and both substances. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 92, p. 48-54, 2008.

VANDREY, R. G. A cross-study comparison of cannabis and tobacco withdrawal. **American Journal on Addictions**, v. 14, p. 54-63, 2005.

VEENEMA, A. H.; NEUMANN, I. D. Maternal separation enhances offensive play-fighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, p. 463-467, 2009.

VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Glucocorticoids disrupt neuroendocrine and behavioral responses during lactation. **Endocrinology**, 2011.

VILELA, F.C. et al. The CB1 cannabinoid receptor mediates glucocorticoid-induced effects on behavioural and neuronal responses during lactation. **Eur. J. Physiol.**, 2013.

VIVEROS, M.P. et al. Endocannabinoid system and synaptic plasticity: implications for emotional responses. **Neural Plast.**, v. 2007, article ID 52908, 12p., 2007.

WEISNER, B. P.; SHEARD, N. M. Maternal behavior in the rat. **Oliver and Boyd**, London, 1933.

WILSON, R. I.; KUNOS, G.; NICOLL, R. A. Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. **Neuron.**, v. 31, p. 453-462, 2001.

WOODSIDE, B. Prolactin and the hyperphagia of lactation. **Physiology & Behavior**, v. 91, n. 4, p. 375-382, 2007.

WOTJAK, C. T. Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 5, p. 659-670, 2005.

YANCEY, S. L.; OVERTON, J. M. Cardiovascular responses to voluntary and treadmill exercise in rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 75, p. 1334-1340, 1993.

ZANETTINI, C. et al. Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. **Front. Behav. Neurosci.**, v. 5, p. 57, 2011.

ZUARDI, A. W. History of cannabis as a medicine: a review. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 28, p. 153-157, 2006.