

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS-MG

FABIANA CARDOSO VILELA

**ENDOCANABINÓIDES MODULAM OS EFEITOS
INIBITÓRIOS DOS GLICOCORTICÓIDES SOBRE AS
RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS E COMPORTAMENTAIS
DURANTE A LACTAÇÃO**

Alfenas-MG

2011

FABIANA CARDOSO VILELA

**ENDOCANABINÓIDES MODULAM OS EFEITOS
INIBITÓRIOS DOS GLICOCORTICÓIDES SOBRE AS
RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS E COMPORTAMENTAIS
DURANTE A LACTAÇÃO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de concentração: neuroendocrinologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Alfenas-MG

2011

Vilela, Fabiana Cardoso.

Endocanabinóides modulam os efeitos inibitórios dos glicocorticóides sobre as respostas neuroendócrinas e comportamentais durante a lactação / Fabiana Cardoso Vilela. - 2011.

134 f. -

Orientador: Alexandre Giusti-Paiva.

Tese (doutorado em Ciências Fisiológica) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2011.

Bibliografia.

1. Comportamento Materno. 2. Prolactina. 3. Ocitocina. 4. Glucocorticóides. 5. Endocanabinóides. I. Giusti-Paiva, Alexandre. II. Título.

CDD: 612

FABIANA CARDOSO VILELA

**ENDOCANABINÓIDES MODULAM OS EFEITOS
INIBITÓRIOS DOS GLICOCORTICÓIDES SOBRE AS
RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS E COMPORTAMENTAIS
DURANTE A LACTAÇÃO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de concentração: neuroendocrinologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Alfenas-MG

2011

FABIANA CARDOSO VILELA

**ENDOCANABINÓIDES MODULAM OS EFEITOS
INIBITÓRIOS DOS GLICOCORTICÓIDES SOBRE AS
RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS E COMPORTAMENTAIS
DURANTE A LACTAÇÃO**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de concentração: neuroendocrinologia.

Aprovada em:

Prof^o. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof^o. Dr. Carlos Giovani de Oliveira Nascimento

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof^o. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Instituição: Universidade de São Paulo, FMRP-SP

Prof^o. Dr. Renato Rizo Ventura

Instituição: Universidade Federal do Paraná

Prof^a. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão

Instituição: Universidade de São Paulo, FMRP-SP

*Dedico este trabalho ao meu orientador
e grande amigo Alexandre Giusti-Paiva.*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação e o desenvolvimento desse trabalho, em especial:

Aos meus pais, Rosangela e Nilson, meus maiores exemplos de perseverança e determinação, por serem meus grandes amigos e incentivadores das minhas escolhas, pelo amor e carinho, por compreenderem minha ausência e por serem meus verdadeiros orientadores em minha vida.

Ao Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva, pela confiança depositada ao longo desses anos, por acreditar neste trabalho, pelos ensinamentos, pela orientação e pelo convívio. Obrigada pela amizade e pela parceria que formamos. Tanta confiança e dedicação foram capazes de me fazer trilhar por um crescimento profissional e pessoal que julgava impossível em tão pouco tempo.

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues e a Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias por disponibilizarem o laboratório de Neuroendocrinologia da FMRP-SP para as dosagens hormonais e para os procedimentos imunoistoquímicos.

A pós-doutoranda Silvia Ruginsk pelos ensinamentos, disponibilidade e grande ajuda na implantação da imunoistoquímica em nosso laboratório.

A minha orientada de TCC Carla, que me ajudou nos experimentos, pela grande experiência em orientá-la e por confiar no meu trabalho.

Aos técnicos Marina e José por terem cuidado das minhas ratas com tanto carinho e dedicação, e a Fátima por cuidar da limpeza do nosso laboratório.

A todos os professores e pós-graduandos do Laboratório de Fisiologia pela convivência, boas conversas e por tornarem nosso laboratório um local muito bom de trabalhar.

A minha grande amiga Lidiane, minha irmã, que sempre esteve ao meu lado durante todos os momentos desta caminhada. Sua amizade foi essencial durante esses anos. Obrigada por ser tão presente em minha vida e por ser uma grande companheira de laboratório. Nunca me esquecerei do nosso convívio diário, das nossas dificuldades e das nossas farras.

As minhas queridas amigas e companheiras de laboratório, Heloísa, Danielle e Fernanda. Obrigada pela amizade, companheirismo e incentivo. Sem vocês tudo teria sido mais difícil.

Aos meus amigos de “cursão”: Luciana, Maria Ângela e Michael. Pelos difíceis, mas bons momentos que passamos juntos.

A UNIFAL-MG pelo grande apoio ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro.

RESUMO

Tem sido demonstrado que os glicocorticóides podem modular a secreção de prolactina e ocitocina, mas a influência dos glicocorticóides sobre as respostas neuroendócrinas e comportamentais em ratas lactantes era pouco conhecida. Portanto, nós avaliamos a influência da dexametasona (glicocorticóide exógeno) e da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pela administração de LPS nas respostas neuroendócrinas e comportamentais durante a lactação. Além disso, nós verificamos se os efeitos produzidos pelos glicocorticóides são mediados pelos endocanabinóides. Para isto, nós utilizamos um antagonista de receptor CB1 (AM251) após a administração da dexametasona. Para confirmar a possível participação do sistema canabinóide nas respostas neuroendócrinas e comportamentais durante a lactação, nós utilizamos um agonista de receptor CB1 (WIN 55,212-22). O tratamento com a dexametasona atenuou as respostas neuroendócrinas e comportamentais em ratas lactantes, pois reduziu a secreção de ocitocina e prolactina, diminuiu o comportamento materno, assim como o agressivo, reduziu o ganho de peso da ninhada, reverteu a ansiólise materna, diminuiu a expressão de c-Fos na BST, MnPOv e MnPOd e, reduziu o número de duplas marcações para c-Fos/ocitocina em neurônios do PVN e SON. O tratamento com AM251 reverteu a maioria desses efeitos, sugerindo assim o envolvimento dos endocanabinóides nessas alterações. A redução nas respostas endócrinas e comportamentais durante a lactação produzidas pela administração do LPS é mediada por glicocorticóides, pois a metirapona (inibidor de síntese de glicocorticóides) reverteu parte dos efeitos produzidos pelo LPS. O tratamento com WIN 55,212-2 reduziu as respostas neuroendócrinas e comportamentais em ratas lactantes, confirmando assim nossa hipótese de que os efeitos dos glicocorticóides são mediados pelos endocanabinóides. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o tratamento com a dexametasona em ratas lactantes diminuiu a secreção de prolactina e ocitocina, seguida pela redução das respostas comportamentais e estes efeitos são mediados pelos endocanabinóides.

Palavras-chave: Comportamento materno. Prolactina. Ocitocina. Glicocorticóides. Endocanabinóides.

ABSTRACT

It has been shown that glucocorticoids can modulate prolactin and oxytocin secretion, but the influence of glucocorticoids on the neuroendocrine and behavioral responses during lactation was not well known. Therefore, we evaluated the influence of dexamethasone (exogenous glucocorticoid) and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by administration of LPS on the neuroendocrine and behavioral responses during lactation. In addition, we verified if the effects produced by glucocorticoids are mediated by endocannabinoids. For this purpose, we used a CB1 receptor antagonist (AM251) following the administration of dexamethasone. To confirm the possible involvement of the cannabinoid system on the neuroendocrine and behavioral responses during lactation, we used a CB1 receptor agonist (WIN 55,212-2). The dexamethasone treatment disrupted neuroendocrine and behavioral responses during lactation, because reduced oxytocin and prolactin, decreased maternal behavior as well as aggressive behavior, reduced litter weight gain, reverted the maternal anxiety and decreased the number of c-Fos positive neurons in the BST, MnPOv and MnPOd, and reduced the number of c-Fos/OT double labeled neurons in PVN and SON. The AM251 treatment reverted most of the effects produced by dexamethasone, suggesting the involvement of endocannabinoids in these effects. The changes in the endocrine and behavioral responses during lactation produced by administration of LPS are mediated by glucocorticoids, since metyrapone (glucocorticoids synthesis inhibitor) reverted some effects produced by LPS. The treatment with WIN 55,212-2 reduced the neuroendocrine and behavioral responses in lactating female rats, confirming our hypothesis that the effects of glucocorticoids are mediated by endocannabinoids. Taken together, our results suggest that dexamethasone treatment in lactating rats disrupts prolactin and oxytocin secretion, and this is followed by an attenuation of behavior responses and these effects are mediated by endocannabinoids.

Key words: Maternal behavior. Prolactin. Oxytocin. Glucocorticoids. Endocannabinoids.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Desenho de um subconjunto de comportamentos maternos incluindo recolher filhotes, construir ninho, amamentar, lambar e agressão maternal (contra um intruso).....22
- Figura 2-** Parâmetros de comportamento maternal em ratas. Agrupamento de filhotes (A), preparo para amamentação (B), cifose fisiológica (C) e comportamento maternal total (D)...23
- Figura 3-** Comportamento agressivo maternal -ataque lateral.....26
- Figura 4-** Efeito da administração de salina (1 mL/kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) em ratas lactantes, sobre a construção do ninho (A), latência em segundos para a rata pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho (B), tempo em segundos de *licking pups* (C), porcentagem de permanência sobre os filhotes (D), porcentagem de permanência na posição de cifose (E), porcentagem de comportamento materno total (F), número de *rearings* (G) e tempo em segundos de *self-grooming* (H).....49
- Figura 5-** Efeito da administração de salina (1ml/kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) sobre a latência em segundos para o primeiro ataque (A), número de ataque frontal (B), número de ataque lateral (C), número de ameaça lateral (D), número de mordidas (E), tempo em segundos de *self-grooming* (F) e comportamento maternal em segundos (G).....50
- Figura 6-** Efeito da dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) ou salina (1 mL/kg) sobre a latência em segundos para linha base, esquiva 1 e esquiva 2 (A) e, latência em segundos para fuga (B) em ratas não lactantes e lactantes no labirinto em T elevado.....51
- Figura 7-** Efeito da dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) ou salina (1 mL/kg) sobre o número de entradas na periferia (A), número de entradas no centro (B), número total de entradas (C) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (D) em ratas não lactantes e lactantes no campo aberto.....52

Figura 8- Efeito do tratamento com veículo (1 mL/Kg) ou ocitocina (1 µg/Kg) sobre o ganho de peso da ninhada em gramas em ratas tratadas com salina (1 mL/kg) ou com dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg).....	52
Figura 9- Efeito da dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) ou salina (1 mL/Kg) sobre os níveis plasmáticos de ocitocina (A), prolactina (B) e corticosterona (C) em ratas não lactantes e lactantes.....	53
Figura 10- Efeito do pré-tratamento com veículo (1 mL/Kg) ou metirapona (2 x 50 mg/Kg) em ratas lactantes tratadas com veículo (1 mL/Kg) ou LPS (500 µg/Kg) sobre a construção do ninho (A), latência em segundos para a rata pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho (B), tempo em segundos de <i>licking pups</i> (C), porcentagem de permanência sobre os filhotes (D), porcentagem de permanência na posição de cifose (E), porcentagem de comportamento materno total (F), número de <i>rearings</i> (G) e tempo em segundos de <i>self-grooming</i> (H).....	55
Figura 11- Efeito do pré-tratamento com veículo (1 mL/Kg) ou metirapona (2 x 50 mg/Kg) em ratas lactantes tratadas com veículo (1 mL/Kg) ou LPS (500 µg/Kg) sobre a latência em segundos para o primeiro ataque (A), número de ataque frontal (B), número de ataque lateral (C), número de ameaça lateral (D), número de mordidas (E), tempo em segundos de <i>self-grooming</i> (F) e comportamento materno em segundos (G).....	56
Figura 12- Efeito do pré-tratamento com veículo (1 mL/Kg) ou metirapona (2 x 50 mg/Kg) em ratas lactantes tratadas com veículo (1 mL/Kg) ou LPS (500 µg/Kg) sobre a latência em segundos para linha base, esquiva 1 e esquiva 2 (A) e, latência em segundos para fuga (B) em ratas lactantes no labirinto em T elevado.....	57
Figura 13- Efeito do pré-tratamento com veículo (1 mL/Kg) ou metirapona (2 x 50 mg/Kg) em ratas lactantes tratadas com veículo (1 mL/Kg) ou LPS (500 µg/Kg) sobre o número de entradas na periferia (A), número de entradas no centro (B), número total de entradas (C) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (D) em ratas lactantes no campo aberto.....	58

Figura 14- Efeito do pré-tratamento com veículo (1 mL/Kg) ou metirapona (2 x 50 mg/Kg) em ratas lactantes tratadas com veículo (1 mL/Kg) ou LPS (500 µg/Kg) sobre os níveis plasmáticos de ocitocina (A), prolactina (B) e corticosterona (C) em ratas lactantes.....59

Figura 15- Efeito do tratamento com antagonista do receptor CB1 (AM251; 3 mg/kg) em ratas lactantes pré-tratadas com salina (1 mL/kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) sobre a construção do ninho (A), latência em segundos para a rata pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho (B), tempo em segundos de *licking pups* (C), porcentagem de permanência sobre os filhotes (D), porcentagem de permanência na posição de cifose (E), porcentagem de comportamento materno total (F), número de *rearings* (G) e tempo em segundos de *self-grooming* (H).....60

Figura 16- Efeito do tratamento com antagonista do receptor CB1 (AM251; 3 mg/kg) em ratas lactantes pré-tratadas com salina (1 mL/kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) sobre a latência em segundos para o primeiro ataque (A), número de ataque frontal (B), número de ataque lateral (C), número de ameaça lateral (D), número de mordidas (E), tempo em segundos de *self-grooming* (F) e comportamento maternal em segundos (G).....61

Figura 17- Efeito do tratamento com antagonista do receptor CB1 (AM251; 3 mg/kg) em ratas lactantes pré-tratadas com salina (1 mL/kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) sobre a latência em segundos para linha base, esquiva 1 e esquiva 2 (A) e, latência em segundos para fuga (B) em lactantes no labirinto em T elevado.....62

Figura 18- Efeito do tratamento com antagonista do receptor CB1 (AM251; 3 mg/kg) em ratas lactantes pré-tratadas com salina (1 mL/kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) sobre o número de entradas na periferia (A), número de entradas no centro (B), número total de entradas (C) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (D) em ratas lactantes no campo aberto.....63

Figura 19- Fotomicrografias representativas (10x) de cortes de encéfalos mostrando células positivas para c-Fos na BST (A), MnPOd (B) e MnPOv (C) em ratas lactantes pré-tratadas com salina (1 mL/Kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) seguido pelo tratamento com

veículo (1 mL/Kg) ou AM251 (3 mg/Kg). Escala: 100 µm. Ao lado estão os gráficos do número de células positivas para c-Fos para cada quadro de fotomicrografias.....64

Figura 20- Fotomicrografias representativas (20x) de cortes de encéfalos mostrando células positivas para c-Fos nos neurônios ocitocinérgicos do PVN (A) e do SON (B) em ratas lactantes pré-tratadas com salina (1 mL/Kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) seguido pelo tratamento com veículo (1 mL/Kg) ou AM251 (3 mg/Kg). Em detalhe, o citoplasma de neurônios ocitocinérgicos ou dupla marcação c-Fos/OT. Escala: 50 µm. Ao lado estão os gráficos do número de células positivas para c-Fos nos neurônios ocitocinérgicos para cada quadro de fotomicrografias.....65

Figura 21- Efeito do tratamento com antagonista do receptor CB1 (AM251; 3 mg/kg) em ratas lactantes pré-tratadas com salina (1 mL/kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) sobre o ganho de peso da ninhada.....66

Figura 22- Efeito da administração de agonista do receptor CB1, WIN (nas doses de 1 e 3 mg/Kg) sobre a construção do ninho (A), latência em segundos para a rata pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho (B), tempo em segundos de *licking pups* (C), porcentagem de permanência sobre os filhotes (D), porcentagem de permanência na posição de cifo (E), porcentagem de comportamento materno total (F), número de *rearings* (G) e tempo em segundos de *self-grooming* (H).....67

Figura 23- Efeito da administração de agonista do receptor CB1, WIN (nas doses de 1 e 3 mg/Kg) sobre a latência em segundos para o primeiro ataque (A), número de ataques frontal (B), número de ataques lateral (C), número de ameaça lateral (D), tempo em segundos de *self-grooming* (E) e comportamento materno em segundos (F).....68

Figura 24- Efeito da administração de agonista do receptor CB1, WIN (nas doses de 1 e 3 mg/Kg) sobre a latência em segundos para linha base, esquiva 1 e esquiva 2 (A) e, latência em segundos para fuga (B) em ratas lactantes no labirinto em T elevado.....68

Figura 25- Efeito da administração de agonista do receptor CB1, WIN (nas doses de 1 e 3 mg/Kg) sobre o número de entradas na periferia (A), número de entradas no centro (B),

número total de entradas (C) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (D) em ratas não lactantes e lactantes no campo aberto.....69

Figura 26- Fotomicrografias representativas (10x) de cortes de encéfalo mostrando células positivas para c-Fos na BST (A), MnPOd (B) e MnPOv (C) em ratas lactantes pré-tratadas com WIN (1 mg/Kg) e WIN (3 mg/Kg). Escala: 100 µm. Abaixo estão os gráficos do número de células positivas para c-Fos para cada quadro de fotomicrografias.....70

Figura 27- Fotomicrografias representativas (20x) de cortes de encéfalo mostrando células positivas para c-Fos nos neurônios ocitocinérgicos do PVN (A) e do SON (B) em ratas lactantes pré-tratadas WIN (1 mg/Kg) e WIN (3 mg/Kg). Em detalhe, o citoplasma de neurônios ocitocinérgicos ou dupla marcação c-Fos/OT. Escala: 50 µm. Abaixo estão os gráficos do número de células positivas para c-Fos nos neurônios ocitocinérgicos para cada quadro de fotomicrografias.....71

Figura 28- Efeito da administração de agonista do receptor CB1, WIN (nas doses de 1 e 3 mg/Kg) sobre o ganho de peso da ninhada em gramas.....72

Figura 29- Modelo para ações mediadas por canabinóides do PVN no eixo HHA. Os glicocorticóides nas proximidades dos neurônios parvocelulares ligam-se a receptores para glicocorticóides localizados na membrana. A ligação dos glicocorticóides com seus receptores promove a síntese de endocanabinóides, o qual é liberado para a fenda sináptica. Após difusão, os endocanabinóides ligam-se a seus receptores ocasionando a diminuição na liberação de glutamato para os neurônios parvocelulares de CRH. Isto leva a uma diminuição na liberação de CRH para as células (A). Bloqueio de receptores CB1 ocasiona uma normalização na liberação de glutamato e assim, normalização na liberação de CRH para as células (B). Parvo: neurônio parvocelular; PLC: fosfolipase C; DAG: diacilglicerol.....85

Figura 30- Esquema do modelo proposto para a participação dos endocanabinóides nos efeitos produzidos pelos glicocorticóides em neurônios magnocelulares e parvocelulares do PVN.....86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG- 2-araquidonoil glicerol

ACTH- hormônio adrenocorticotrópico

AM251- antagonista de receptor de canabinóide tipo 1

BST- lamina da estria terminal

CA- comportamento agressivo

CB1- receptor canabinóide tipo 1

CB2- receptor canabinóide tipo 2

CM- comportamento materno

CMT- comportamento materno total

CRH- hormônio liberador de corticotropina

DAB- diaminobenzidina

DAG- diacilglicerol

DEXA- dexametasona

DOC- deoxicorticosterona

FSH- hormônio folículo estimulante

GABA- ácido γ -aminobutírico

GRm- receptor de glicocorticóide da membrana celular

HHA- hipotálamo-hipófise-adrenal

i.p.- intraperitoneal

IL-1- interleucina 1

IL-6- interleucina 2

LH- hormônio luteinizante

LPS- lipopolissacarídeo

MnPO- núcleo pré-óptico mediano

OT: ocitocina

PBS- tampão fosfato

PBS- tampão fosfato

PLC- fosfolipase C

PVN- núcleo paraventricular

RNA_m- ácido ribonucléico

SNC- sistema nervoso central

SON- núcleo supraóptico

THC- Δ^9 -tetra-hidrocanabinol

TNF- α - fator de necrose tumoral

WIN55,212-2- agonista de receptor de canabinóide tipo 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 ANIMAIS.....	35
3.2 ACASALAMENTO.....	35
3.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO DE RATAS LACTANTES.....	35
3.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO AGRESSIVO DE RATAS LACTANTES....	36
3.5 LABIRINTO EM T ELEVADO.....	36
3.6 CAMPO ABERTO.....	37
3.7 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA E DOSAGEM HORMONAL.....	37
3.8 IMUNOISTOQUÍMICA PARA c-Fos e c-Fos/OT.....	38
3.9 DROGAS UTILIZADAS.....	39
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	40
4.1 EFEITO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO MATERNO.....	41
4.2 EFEITO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO.....	41
4.3 EFEITO DA DEXAMETASONA NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO.....	41
4.4 EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE O GANHO DE PESO DA NINHADA.....	41
4.5 EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE OCITOCINA, PROLACTINA E CORTICOSTERONA.....	42
4.6 EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE A ATIVAÇÃO DE c-Fos EM NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS.....	42
4.7 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA NO COMPORTAMENTO MATERNO: POSSÍVEL MEDIAÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES.....	43

4.8 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO: POSSÍVEL MEDIAÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES.....	43
4.9 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO: POSSÍVEL MEDIAÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES	43
4.10 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE OCITOCINA, PROLACTINA E CORTICOSTERONA	44
4.11 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO MATERNO.....	44
4.12 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO	44
4.13 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO.....	45
4.14 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NA EXPRESSÃO DE c-Fos NA BST E MnPO E EM NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS NO PVN E SON.....	45
4.15 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO GANHO DE PESO DA NINHADA	45
4.16 EFEITO DO WIN55,212-2 (AGONISTA DO RECEPTOR CB1) NO COMPORTAMENTO MATERNO	46
4.17 EFEITO DO WIN55,212-2 (AGONISTA DO RECEPTOR CB1) NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO	46
4.18 EFEITO DO WIN55,212-2 NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO	46
4.19 EFEITO DO WIN55,212-2 NA EXPRESSÃO DE c-Fos NA BST E MNPO E EM NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS NO PVN E SON.....	47
4.20 EFEITO DO WIN55,212-2 SOBRE O GANHO DE PESO DA NINHADA	47
5. RESULTADOS	48
5.1 EFEITO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO MATERNO	49
5.2 EFEITO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO.....	50
5.3 EFEITO DA DEXAMETASONA NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO	50
5.4 EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE O GANHO DE PESO DA NINHADA	52

5.5 EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE OCITOCINA, PROLACTINA E CORTICOSTERONA.....	53
5.6 EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE A ATIVAÇÃO DE c-Fos EM NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS.....	54
5.7 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HIPOTÁLAMO-HOPÓFISE-ADRENAL (HHA) NO COMPORTAMENTO MATERNO: POSSÍVEL MEDIAÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES.....	54
5.8 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO: POSSÍVEL MEDIAÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES.....	55
5.9 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO: POSSÍVEL MEDIAÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES.....	56
5.10 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE OCITOCINA, PROLACTINA E CORTICOSTERONA.....	58
5.11 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO MATERNO.....	59
5.12 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO.....	60
5.13 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO.....	61
5.14 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NA EXPRESSÃO DE c-Fos NA BST E MnPO E EM NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS NO PVN E SON.....	63
5.15 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO GANHO DE PESO DA NINHADA.....	66
5.16 EFEITO DO WIN55,212-2 (AGONISTA DO RECEPTOR CB1) NO COMPORTAMENTO MATERNO.....	66
5.17 EFEITO DO WIN55,212-2 (AGONISTA DO RECEPTOR CB1) NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO.....	67
5.18 EFEITO DO WIN55,212-2 NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO.....	68
5.19 EFEITO DO WIN55,212-2 NA EXPRESSÃO DE c-FOS NA BST E MNPO E EM NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS NO PVN E SON.....	69
5.20 EFEITO DO WIN55,212-2 SOBRE O GANHO DE PESO DA NINHADA.....	71

6. DISCUSSÃO	73
6.1 EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE AS RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS E COMPORTAMENTAIS EM RATAS LACTANTES.....	74
6.2 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA SOBRE AS RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS E COMPORTAMENTAIS EM RATAS LACTANTES.....	80
6.3 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE AS RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS E COMPORTAMENTAIS EM RATAS LACTANTES.....	83
6.4 EFEITO DO WIN55,212-2 (AGONISTA DO RECEPTOR CB1) SOBRE AS RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS E COMPORTAMENTAIS EM RATAS LACTANTES.....	87
7. CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXOS	106



1. INTRODUÇÃO

Em mamíferos, o conjunto de cuidados que a mãe oferece aos filhotes é denominado comportamento materno (CM). O cuidado maternal é um comportamento complexo, espontâneo, instintivo e com características determinadas por modificações fisiológicas que ocorrem pouco antes ou logo após o parto (NUMAN, 1994; MATTSON *et al.*, 2001). Durante este período especial, a meta da fêmea é garantir a sobrevivência própria e de seus filhotes.

O comportamento materno inclui ações que as fêmeas executam para garantir o sucesso no desenvolvimento de seus filhotes (MANN, 2006). Os filhotes de ratas nascem parcialmente imóveis, desprovidos de pêlos, surdos, cegos, incapazes de se locomoverem e de regularem sua temperatura (GROTA; ADER, 1969; GUBERNICK; KLOPFER, 1981). Em roedores, o comportamento materno pode ser observado com mais intensidade durante as duas primeiras semanas após o parto, declinando posteriormente, até que os filhotes cresçam e se tornam mais independentes, capazes de se auto-proverem de comida e de se regularem termicamente. Neste momento, a mãe se torna também menos responsiva em relação às primeiras demandas da prole (NUMAN, 1994).

Em ratas, as ações maternais são observadas e registradas quando a rata apresenta comportamentos diretamente relacionados aos filhotes como construção do ninho, estimulação à micção através da lambida ano-genital, agrupamento dos filhotes no ninho e posicionamento sobre eles para provê-los de nutrição e calor, além do comportamento indireto agressivo (MANN, 2006) (Figura 1).

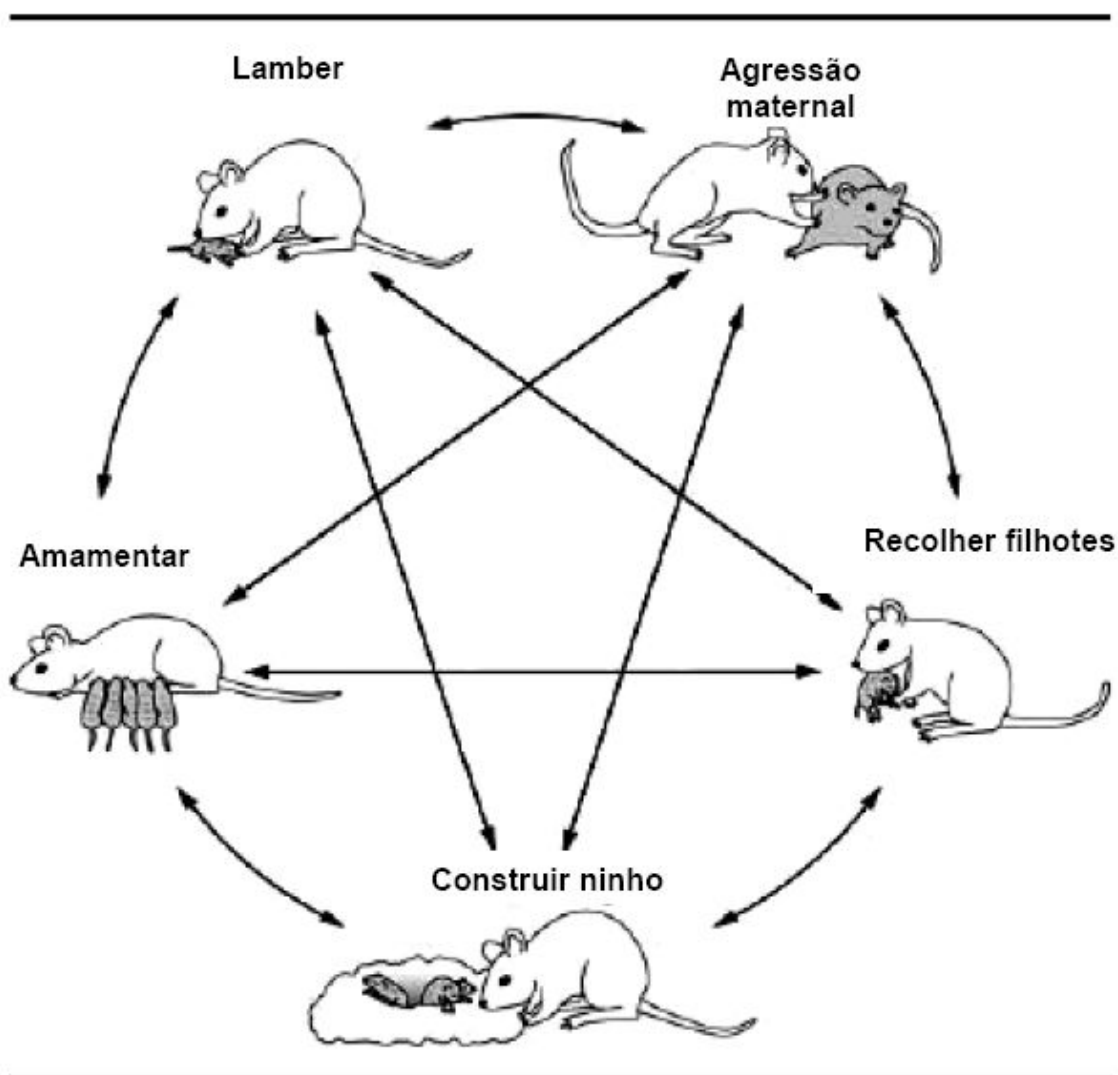


Figura 1: Desenho de um subconjunto de comportamentos maternos incluindo recolher filhotes, construir ninho, amamentar, lamber e agressão maternal (contra um intruso) adaptado de GRAMMIE 2005.

No ninho, a rata lactante geralmente fica sobre os filhotes em uma postura denominada de cifo fisiológica, na qual sua coluna fica arqueada, facilitando assim a amamentação. Além disso, as lactantes passam um tempo significativo lambendo a cria para limpá-la, sendo que a limpeza da área ano-genital estimula a defecação e micção dos filhotes (GUBERNICK; ALBERTS, 1983) bem como a diferenciação sexual do SNC (sistema nervoso central) da prole masculina (DOHLER, 1991).

A posição de cifo e outros parâmetros do comportamento materno podem ser observados na figura 2:

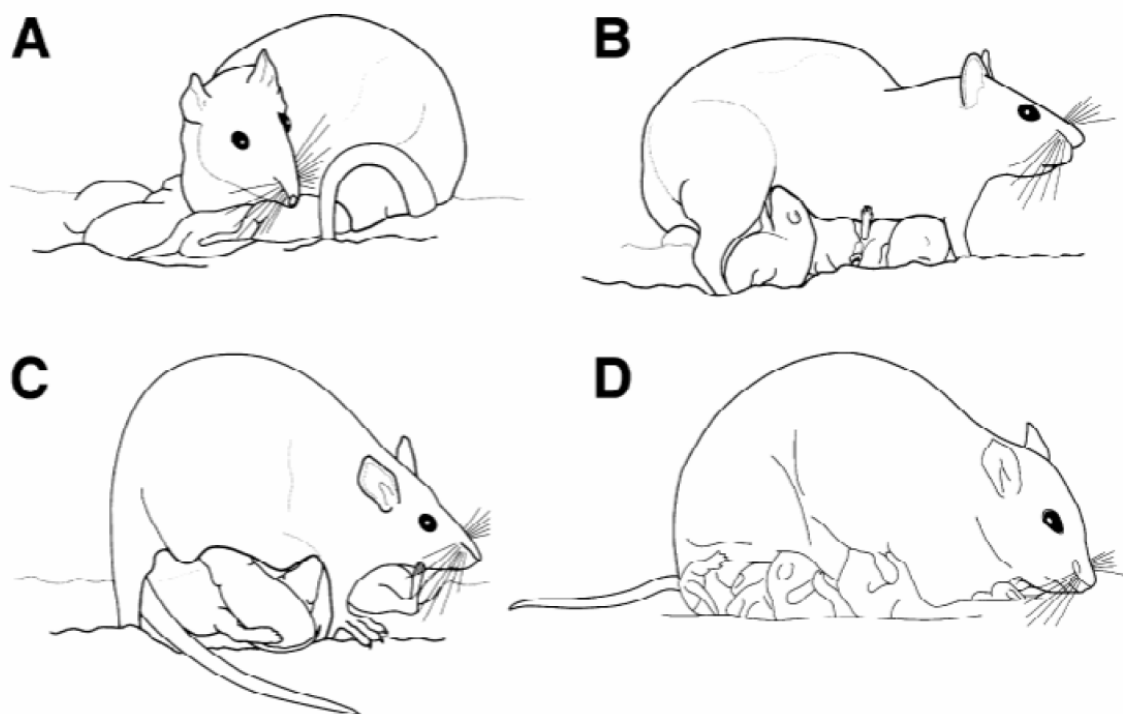


Figura 2: Parâmetros de comportamento maternal em ratas. Agrupamento de filhotes (A), preparo para amamentação (B), cifose fisiológica (C) e comportamento maternal total (D). Fonte: NUMAN, 1994.

Diversos fatores ambientais, psicológicos, biológicos e neurais interagem para promover e manter o CM. Assim como mudanças hormonais geram respostas fisiológicas e comportamentais compensatórias, mudanças ambientais também levam alterações hormonais (SCHULKIN, 1999).

Wiesner e Sheard (1933) foram os primeiros a sugerirem que alterações fisiológicas que acontecem durante o final da gestação poderiam ser responsáveis pelo aparecimento do CM. Estes autores demonstraram que o início da responsividade materna em ratas lactantes coincidia com o nascimento dos filhotes, uma vez que logo após o parto a mãe cuidava não só de seus filhotes como também de filhotes adotivos. Fêmeas nulíparas prenhas (1 a 9 dias de gestação) e fêmeas virgens não cuidavam de filhotes adotivos. Em pesquisas consecutivas, esses mesmos autores verificaram que as fêmeas virgens poderiam passar a cuidar de filhotes adotivos após alguns dias (4 a 7 dias), se estes passassem a viver no mesmo ambiente que o delas.

Sheehan e colaboradores (2000) verificaram que a contínua exposição aos filhotes pode induzir mudanças hormonais em fêmeas nulíparas, num processo denominado de concavenação ou sensibilização. Uma forma de interpretar esses achados é que os processos que inibem a responsividade materna seriam superados pelas alterações hormonais

semelhantes às que ocorrem no parto, tendo por consequência o surgimento do CM (YIM *et al.*, 2006).

No CM após o parto estão envolvidos hormônios relacionados à gestação e à lactação (estrógeno, progesterona, prolactina e ocitocina) e participam do controle de áreas cerebrais como hipocampo, amígdala, área pré-óptica medial, área tegmentar ventral e *nucleus accumbens* (NUMAN, 1994; FLEMING; WALSH, 1994). Além dessas áreas, a estria da lâmina terminal é uma área que está diretamente relacionada com o comportamento materno e agressivo, e ainda, possui alta densidade de receptores para ocitocina (CONSIGLIO *et al.*, 2005; BOSCH *et al.*, 2010).

A amamentação é um estímulo caracterizado pelo toque, contato, pressão e repuxamento dos mamilos (FINDLAY, 1966) que elicia reflexos neuroendócrinos próprios da lactação como a secreção de prolactina e ocitocina (WAKERLEY, 1996). O papel vital da prolactina durante a gestação e mais fortemente durante a lactação é marcado por adaptações fisiológicas na rata para conseguir manter um estado prolongado de hiperprolactinemia. A prolactina também possui um efeito inibitório sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal durante a lactação, com conseqüente redução neuroendócrina de respostas ao estresse (TORNER *et al.*, 2002; TORNER; NEUMANN, 2002).

Outro CM importante exibido pelas ratas é o comportamento agressivo. 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 emerge durante a gravidez, quando os filhotes não estão fisicamente presentes para prover estímulos sensoriais. Nesse período, a influência ativa parece ser provida por hormônios (MAYER *et al.*, 1987).

Ratas lactantes demonstram altos níveis de agressividade durante as duas primeiras semanas após o parto e, após este período, há um declínio na agressividade embora a lactação continue (GIONEVARO *et al.*, 2005).

Diversas áreas hipotalâmicas e regiões límbicas como área pré-óptica medial, núcleo para ventricular (PVN), amígdala e estria da lâmina terminal (BST), são responsáveis pelo desenvolvimento da agressão maternal. A ocitocina atuando nessas regiões pode modular os cuidados maternos e a agressão maternal. No entanto, a participação da ocitocina na agressão maternal parece ser de uma forma indireta, ou seja, a ocitocina aumentaria a agressão maternal por diminuir a ansiedade. Isso seria um fato importante para que a rata lactante

respondesse adequadamente a uma ameaça contra um macho intruso (BOSCH *et al.*, 2005; BOSCH; 2010).

O comportamento agressivo (CA) de ratas com filhotes contra um macho intruso é similar a de machos dominantes em colônias. Elas apresentam uma sequência de ataque lateral (comportamento ofensivo), estendendo o dorso, tomando uma postura arqueada, embora seja menos frequente do que observado em machos dominantes. A maioria das mordidas de machos dominantes em intrusos resulta numa lesão sendo que as fêmeas dificilmente produzem um dano físico. Outra diferença importante é o alvo destas mordidas.

Ao contrário dos machos, uma considerável frequência de mordidas das fêmeas é dirigida à cabeça e à região do focinho do intruso. As fêmeas apresentam o padrão de ataque frontal, o qual não é observado em machos dominantes (BLANCHARD; BLANCHARD, 1991). O ataque frontal é um comportamento súbito, muito rápido, pois não apresenta comportamentos associados como piloereção e/ou dorso arqueado. Esta forma de agressão que ocorre em resposta a uma ameaça ou medo é motivada e geralmente é precedida por fugas (BRAIN, 1981). Os alvos das mordidas das fêmeas e a ocorrência de ataque frontal sugerem que existe um elemento de defesa ou medo na reação de uma fêmea em direção a um intruso. Assim, o ataque frontal tem sido considerado como um comportamento defensivo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1981).

Em roedores, essas alterações comportamentais observadas após o parto parecem depender de mudanças hormonais que ocorrem no final da gestação, parto e início da lactação, bem como da presença dos filhotes (GIOVENARD *et al.*, 2005). Os filhotes fornecem à mãe uma variedade de sinais táteis e olfatórios que são importantes para a manutenção da agressão maternal em ratas lactantes. O recebimento de sinais apenas visuais e auditivos é incapaz de manter a agressão maternal e a remoção cirúrgica desses sentidos não afetam o comportamento agressivo das mães (LOSTEIN; GAMMIE, 2002).

Na figura 3, pode-se observar um parâmetro agressivo típico de ratas lactantes:



Figura 3: Comportamento agressivo maternal – ataque lateral

Alguns trabalhos correlacionam o aumento do comportamento agressivo com a diminuição do medo (LONSTEIN; GAMMIE, 2002). Ratas lactantes demonstram ansiedade diminuída nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado quando comparadas com ratas não lactantes. A redução da ansiedade pode ser considerada parte de um repertório comportamental maternal e pode ser denominada como ansiólise maternal (FERREIRA *et al.*, 2002).

A ansiólise maternal certamente é resultado de uma adaptação do SNC que é necessária para a sobrevivência da prole. A responsividade reduzida à ansiedade observada durante a lactação pode ser explicada, pelo menos em parte, por um aumento da secreção de ocitocina e prolactina já que ambos possuem propriedades ansiolíticas. Estudos anteriores demonstraram que altos níveis de ocitocina e prolactina diminuíram a responsividade emocional observada na lactação (NUMAM, 1994; FLEMING; ROSEMBLATT, 1974; FLEMING; WALSH, 1994).

Portanto, pode-se considerar que a agressividade e a ansiólise maternal fazem parte do repertório comportamental de ratas lactantes e que diversos fatores como, por exemplo, fatores hormonais, podem modular o CM.

Sendo assim, a manutenção do CM depende do contato direto das mães com sua prole resultando na secreção de hormônios que são essenciais para o desenvolvimento de diversas ações que as lactantes executam para garantir a sobrevivência própria e de seus filhotes. Ambos os hormônios prolactina e ocitocina são secretados a partir da hipófise e estão sob o controle hipotalâmico. Estes hormônios estão envolvidos na lactação e atuam como importantes componentes das vias neurobiológicas fundamentais para o início e manutenção do CM (BOSCH, 2011; BRIDGES *et al.*, 1985; HIGUCHI *et al.*, 1985).

A sucção mamilar estimula a secreção de prolactina e ocitocina, no entanto, a secreção desses hormônios pode ser modulada em resposta a vários outros estímulos, incluindo aumento da osmolaridade plasmática, expansão do volume sanguíneo e estressores físicos e psicológicos (LEE *et al.*, 2009).

Alguns estudos demonstraram que a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e a conseqüente secreção de glicocorticóide (corticosterona) podem reduzir a secreção de prolactina e ocitocina estimulada pela expansão de volume isotônica e hipertônica em ratos (DURLO *et al.*, 2004, RUGINSK *et al.*, 2007; LAUAND *et al.*, 2007). Isto indica que o estresse e a conseqüente ativação do eixo HHA, pode interferir com a secreção de outros hormônios neuro-hipofisários.

A secreção de glicocorticóide pelo córtex da adrenal exerce um efeito inibitório em diversos sistemas neuroendócrinos hipotalâmicos, incluindo, mas não limitando, ao feedback negativo do eixo HHA por supressão da secreção do fator liberador de corticotropina (CRH) pelos neurônios do núcleo paraventricular (PVN) (HERMAN *et al.*, 1996; KLOET, 2000). A regulação da retroalimentação negativa do eixo HHA ocorre agudamente por uma rápida inibição da secreção de CRH e cronicamente por uma redução da expressão de CRH e vasopressina em neurônios do PVN (KELLER-WOOD; DALLMAN, 1984).

O clássico mecanismo de ação dos glicocorticóides, assim como dos demais hormônios esteróides, é mediado pela ligação do hormônio com receptores intracelulares e a conseqüente regulação da expressão gênica (FALKENSTEIN *et al.*, 2000). Entretanto, recentemente tem sido demonstrado que os glicocorticóides podem ter uma ação rápida, mediada por receptores de membrana e ativação de mecanismos de sinalização não-genômicos (SUYEMITSU; TERAYAMA, 1975; HARRISON *et al.*, 1979; ORCHINIK *et al.*, 1991; AVANZINO *et al.*, 1987; HUA; CHEN, 1989).

O mecanismo proposto envolve a interação do glicocorticóide com seus receptores presentes na membrana celular (GRm) e a ativação de uma cascata de sinalização intracelular

que estimula a síntese de endocanabinóides. O endocanabinóide é liberado e atua em seus receptores (CB1) presentes no terminal pré-sináptico de neurônios glutamatérgicos, provocando a inibição da liberação de glutamato. O menor aporte de glutamato provocaria uma redução da ativação de neurônios do PVN e uma conseqüente redução da secreção hormonal (DI *et al.*, 2003; PATEL *et al.*, 2004; DI *et al.*, 2005a., DI *et al.*, 2005b; TASKER *et al.*, 2006).

Existem alguns agentes estressores, principalmente externos (componente da parede bacteriana dos microorganismos Gram-negativos: endotoxina ou lipopolissacarídeo - LPS) que podem perturbar a homeostase do meio interno gerando uma situação denominada de estresse. Com isso ocorre a ativação do eixo HHA com conseqüente secreção de glicocorticóide (corticosterona) podendo então, conforme dito anteriormente, reduzir a secreção de prolactina e ocitocina.

Durante o estresse, o organismo promove a ativação de alguns sistemas de controle (denominados genericamente de carga alostática), a fim de retornar às condições de equilíbrio. Esta nova situação em que o organismo apresenta-se em equilíbrio apesar da presença do agente estressor é denominada alostase (MCEWEN, 2000; MCEWEN; SEEMAN, 1999).

Entre os sistemas fisiológicos envolvidos no retorno do organismo a uma situação de equilíbrio, destaca-se o sistema nervoso, endócrino e o sistema imune. A resposta do organismo é diferente para os diversos agentes estressores implicando em uma variedade na magnitude de ativação de cada sistema (PACAK; PALKOVITS, 2001). O sistema endócrino tem uma importante função na manutenção da homeostase em diversas situações de estresse, incluindo a endotoxemia (BERTOK, 1998).

O LPS desencadeia uma cascata de eventos que simulam a resposta inflamatória, inicialmente liberando o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1), que estimulam uma intensa resposta celular, com liberação de mediadores secundários, quimiotaxia e ativação de células do sistema imune (RIVEST, 2003).

Os processos inflamatórios e infecciosos agudos induzem uma resposta do organismo denominada resposta de fase-aguda que inclui o desenvolvimento de febre, ativação do eixo HHA, supressão dos eixos tireoidiano e gonadal e alterações comportamentais (comportamento doentio do inglês: *sickness behaviour*) como diminuição do apetite, anedonia, diminuição do comportamento reprodutivo, menor atividade motora e febre (KUSHNER, 1988). A interação entre os sistemas imune e neuroendócrino é bidirecional e

crucial para a manutenção da homeostase, sendo a interface neuro-imuno-endócrina mediada pelas citocinas que atuam como fatores endócrinos, parácrinos ou autócrinos, regulando a proliferação celular, secreção de hormônios e a atividade do eixo HHA (HADDAD *et al.*, 2002).

A produção de citocinas pode ser observada no estabelecimento, manutenção e controle de diversas funções fisiológicas como sono, ovulação e exercícios. Entretanto, durante o desenvolvimento de um processo inflamatório e infeccioso a produção dessas citocinas apresenta-se extremamente elevada (TURNBULL; RIVIER, 1999). É descrito que em resposta a um estímulo inflamatório e infeccioso, como por exemplo, o induzido pela administração de LPS, o sistema imune desencadeia a produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (RAMACHANDRA *et al.*, 1992). Estes estimulam uma intensa resposta celular, com liberação de células do sistema imune (LICINIO; FROST, 2000). Esta atividade do sistema imune é sinalizada para o SNC que desencadeia algumas respostas tais como, febre, anorexia, ativação do eixo HHA, entre outras (RIVIER, SHEN, 1994).

Neste modelo de interação neuro-imuno-endócrina, a regulação da secreção de ocitocina e prolactina tem sido pouco abordada. A ocitocina além de participar do controle hidroeletrólítico (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004), também está envolvida na modulação da secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e a conseqüente secreção de glicocorticóide durante o stress (RIVIER; SHEN, 1994).

Além da hipótese de que os efeitos dos glicocorticóides podem ser mediados por canabinóides, tem sido demonstrado que os canabinóides exógenos como o Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (THC) exercem efeito inibitório sobre a secreção de hormônios neuro-hipofisários. Em ratas lactantes, o THC bloqueia a ejeção de leite mediada pela ocitocina (TYREY; MURPHY, 1988).

A *Cannabis sativa* (maconha) é a droga ilícita mais consumida no mundo a partir de 1960 (ADAMS; MARTIN, 1996). Cultivada há mais de cinco mil anos para a obtenção de fibras utilizadas na manufatura de tecidos, a *Cannabis* era prescrita pelos chineses, desde 2600 A.C. para tratar câimbras, dores reumáticas e menstruais (MECHOULAM, 1986). Porém, só em 1964 o seu princípio ativo THC foi isolado e sua estrutura química caracterizada (GAONI, MECHOULAM, 1964).

Em 1988, o primeiro receptor canabinóide foi identificado (DEVANE *et al.*, 1988). Em 1993, esse receptor foi cognominado CB1, pois nesse mesmo ano, um segundo receptor foi

caracterizado e designado CB2 (MUNRO *et al.*, 1993). Ambos os receptores estão acoplados às proteínas Gi/o e pertencem a uma grande e diversificada família de proteínas acopladas à membrana celular. A distribuição tecidual dessas estruturas explica a maior parte dos efeitos psicotrópicos do THC e atribuídos aos receptores CB1 e, os efeitos dos receptores periféricos CB2 estão mais associados à resposta imune (AMERI, 1999).

Os primeiros ligantes endógenos dos receptores canabinóides, os endocanabinóides, foram isolados em 1992 (DEVANE *et al.*, 1992). Nos dias atuais, a anandamida (*N*-araquidonoil etanolamina) e o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) são entre os canabinóides endógenos, os mais exaustivamente estudados. Ambos os endocanabinóides são agonistas dos receptores CB1 e CB2. Os níveis celulares e teciduais do 2-AG são mais elevados que os da anandamida por conta de seu maior envolvimento em várias vias metabólicas. Os receptores canabinóides, os endocanabinóides e as enzimas que catalisam sua biossíntese e degradação constituem o sistema endocanabinóide.

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que os endocanabinóides e a ativação concomitante de seus receptores CB1 causam uma plethora de efeitos, entre os quais: inibição da secreção de prolactina e do hormônio do crescimento (PAGOTTO *et al.*, 2001), efeitos ansiolíticos por meio de ações sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (NAVARRO *et al.*, 1997), inibição da secreção de testosterona e relaxamento uterino e como citado anteriormente, o THC bloqueia a ejeção de leite mediada pela ocitocina (TYREY; MURPHY, 1988).

Além disso, tem sido demonstrado que a administração de antagonista de receptor CB1, rimonabanto, potencializa a secreção de ocitocina e a expressão de c-Fos em neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos do PVN e do núcleo supraóptico (SON) induzidas por expansão de volume sanguíneo (RUGINSK *et al.*, 2010). Por outro lado, a expressão de mRNA para ocitocina é reduzida pelo rimonabanto, neste mesmo modelo experimental (RUGINSK *et al.*, 2010). Também tem sido demonstrado que outro antagonista do receptor CB1, AM251, bloqueia a secreção de ocitocina induzida por lipopolissacarídeo, sugerindo que os endocanabinóides podem estimular a secreção de ocitocina em modelo experimental de sepse (DE LAURENTIIS *et al.*, 2010). No entanto, a participação do sistema canabinóide sobre as alterações neuroendócrinas e comportamentais durante a lactação ainda não são conhecidos, apesar da demonstração deste sistema em poder modular a secreção de ocitocina que é um dos principais hormônios envolvidos com as respostas comportamentais na lactação.

Portanto, sabendo que os glicocorticóides podem modular a secreção de prolactina e ocitocina, foi estudada a influência da dexametasona (glicocorticóide exógeno) e da ativação do eixo HHA por administração de LPS sobre as respostas comportamentais e neuroendócrinas de ratas lactantes. Neste estudo, foi verificado se as alterações causadas pelo LPS nas respostas comportamentais e neuroendócrinas são mediadas pela liberação de glicocorticóides. Em adição, foi verificado também se a ação dos glicocorticóides é mediada pelo sistema endocanabinóide e por fim foi estudada a influência de um agonista canabinóide sobre as respostas comportamentais e neuroendócrinas de ratas lactantes.



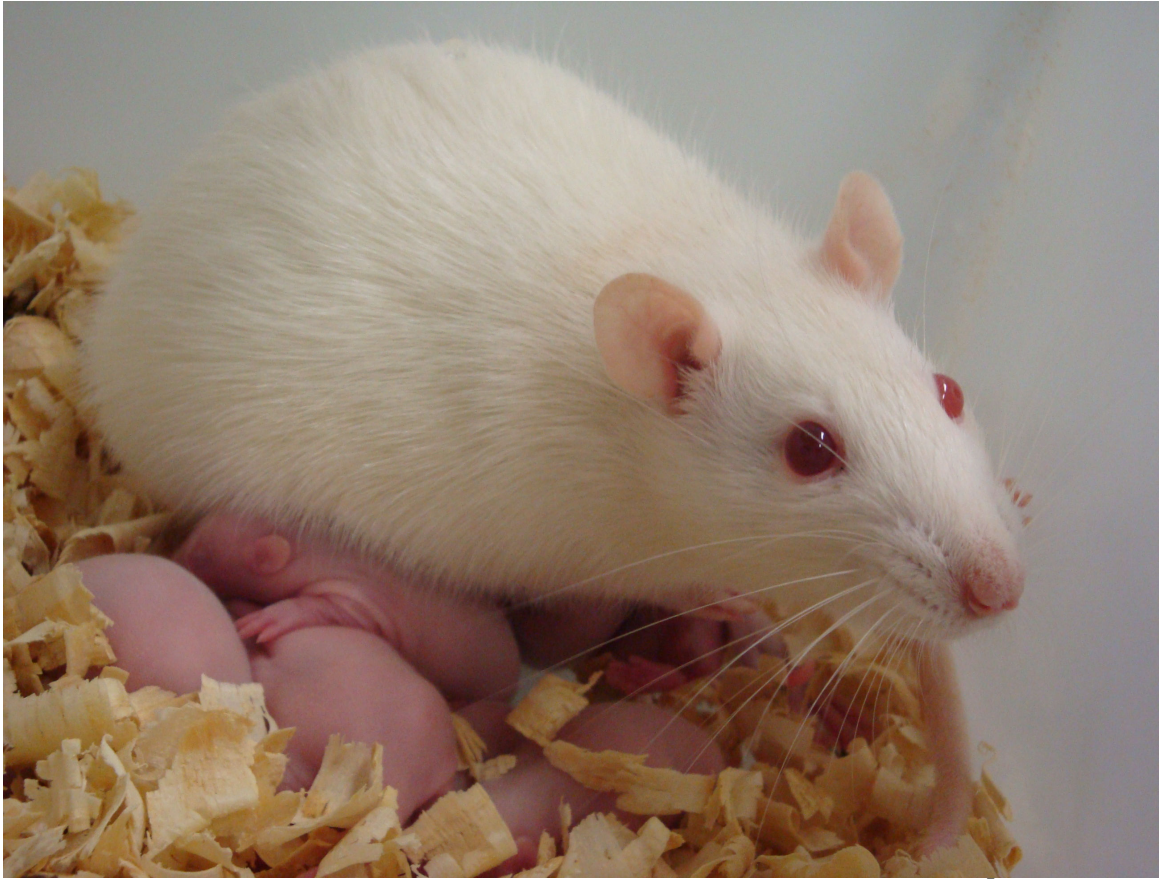
2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

-Avaliar a participação dos glicocorticóides nas respostas comportamentais e neuroendócrinas durante a lactação e investigar se essas respostas são mediadas por endocanabinóides.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da dexametasona sobre as respostas comportamentais e neuroendócrinas em ratas lactantes;
- Avaliar a influência da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal sobre as respostas comportamentais e neuroendócrinas em ratas lactantes;
- Verificar se o efeito da dexametasona é mediado por endocanabinóides em ratas lactantes;
- Avaliar a participação do agonista canabinóide sobre as respostas comportamentais e neuroendócrinas em ratas lactantes.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas Wistar pesando de 180 a 220g, a partir de 8 semanas de vida, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL-MG. As ratas foram alojadas em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção, tratadas com ração comercial e água “*ad libitum*” e mantidas em sala climatizada a 23 ± 2 °C em ciclo 12 horas claro-escuro. Foram também utilizados ratos da mesma linhagem para o acasalamento e para a avaliação do comportamento agressivo 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 gaiola com rato sexualmente experiente para o acasalamento na 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 como sendo o 1º dia de gestação. As ratas prenhas foram separadas individualmente em uma caixa até o nascimento dos filhotes. O dia de nascimento dos filhotes foi considerado como dia zero. No primeiro dia pós-parto as ninhadas foram padronizadas aleatoriamente em oito filhotes. Os experimentos foram realizados no sexto ou sétimo dia de lactação.

3.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO DE RATAS LACTANTES

O comportamento materno foi avaliado no dia 6 ou 7 da lactação no período da manhã entre 7-12 horas. Inicialmente foi anotada a posição do ninho na gaiola moradia. A ninhada foi retirada da gaiola e colocada em caixa aquecida. Após 2 ou 12 horas, os filhotes foram recolocados na gaiola moradia no lado oposto ao ninho inicial e distribuídos de forma não homogênea. Foram então filmados por 30 minutos e, de acordo com descrições encontradas em estudos prévios (CALDJI *et al.*, 1998; CHAMPAGNE *et al.*, 2003; MYERS *et al.*, 1989; SLAMBEROVÁ *et al.*, 2001) foram analisados os seguintes parâmetros:

Comportamento Materno:

1- Porcentagem de tempo em que a rata fica sobre a ninhada em posição apropriada à amamentação (posição arqueada ou cifose);

- 2- Porcentagem de tempo em que a rata fica sobre a ninhada sem estar em posição arqueada;
- 3- Porcentagem de tempo de comportamento materno total (CMT), o que significa ficar em posição de amamentação sobre os filhotes após 2 minutos de permanência em cifose;
- 4- Latência em segundos para busca de cada filhote e levá-lo ao ninho;
- 5- Tempo em segundos em que a lactante lambe os filhotes (*licking pups*).

Comportamento Não- Materno:

- 1- Número de *rearings* (exploração vertical sobre as duas patas traseiras);
- 2- Tempo de *self-grooming* (auto-limpeza).

3.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO AGRESSIVO DE RATAS LACTANTES

Um rato adulto macho jovem (denominado intruso) foi colocado na caixa-moradia onde estavam a rata com sua ninhada para o início do teste que teve duração de 10 minutos. O macho foi colocado do lado oposto à localização do ninho. Foram avaliados de acordo com alguns estudos (CONSIGLIO *et al.*, 2009; VEIGA *et al.*, 2007; CONSIGLIO; BRIDGES, 2009; ALMEIDA; LUCION, 1997) os seguintes parâmetros:

- 1- Latência em segundos para o primeiro ataque;
- 2- Número de ataques frontais;
- 3- Número de ataques laterais;
- 4- Número de ameaças laterais;
- 5- Número de mordidas;
- 6- Tempo de *licking pups* (lambida nos filhotes);
- 7- Comportamento materno (rata sobre os filhotes, lambe os filhotes).

3.5 LABIRINTO EM T ELEVADO

O labirinto em T elevado consiste de um aparato elevado a 50 cm do chão com três braços de mesmas dimensões (50 x 10 cm) sendo um braço fechado por paredes com 40 cm de altura e perpendicular a dois braços abertos opostos. Para evitar quedas, os braços abertos possuem uma proteção de 1 cm de altura. Este teste foi realizado conforme descrito previamente por Viana e colaboradores (1994) e modificado por Calixto e colaboradores (2001). Após os tratamentos, cada rata foi colocada no final do braço fechado e o tempo em que levou para sair com as quatro patas do braço fechado foi registrado e denominado linha

base. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes com intervalos de 30 segundos obtendo-se então esquiva 1 e 2. Após 30 segundos da esquiva 2, colocou-se cada rata no final de um dos braços abertos e verificou-se a latência de deslocamento para o braço fechado com as quatro patas que foi considerado como o tempo de fuga. Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 10%.

3.6 CAMPO ABERTO

Imediatamente após o teste do labirinto em T elevado, as ratas foram colocadas 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 considerados periferia e os 4 demais as centrais. Cada rata foi colocada no centro da arena e filmada por cinco minutos para posterior análise. Foi registrado o número de cruzamentos com as quatro patas no centro, na periferia 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 uma diminuição dessa preferência leva a um efeito anti-tigmotático que pode ser observado no campo aberto e 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%.

3.7 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA E DOSAGEM HORMONAL

Para a avaliação do ganho de peso da ninhada, a ninhada de 8 filhotes foi separada e colocada em uma caixa aquecida (~30°C). Após 12 horas, massageou-se manualmente a bexiga dos filhotes para eliminação de urina, pesou-se a ninhada e a mesma foi recolocada na caixa moradia. Após 15 minutos de amamentação a ninhada foi pesada novamente para determinação do ganho de peso (GROSVENOR; MENA, 1983).

Para coleta do sangue, após 15 minutos de permanência na posição de cifose, as ratas foram decapitadas, o sangue foi coletado do tronco (5 mL), em tubos plásticos, mantidos sob gelo e contendo heparina. O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, 4°C, 15 min.)

e as alíquotas mantidas a -20°C até o momento das dosagens hormonais. As dosagens hormonais de ocitocina, prolactina e corticosterona foram realizadas utilizando-se a técnica de radioimunoensaio, que foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, sob coordenação dos Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues e Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias.

3.8 IMUNOISTOQUÍMICA PARA c-Fos e c-Fos/OT

Após 1 hora e 30 minutos da avaliação do comportamento materno, as ratas foram anestesiadas com tribromoetanol (250 mg/Kg) e perfundidas através de uma punção intracardiaca com salina (250 mL) contendo 5000U/l de heparina, seguido pela perfusão com fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PBS 0,1 M; 500 mL) sendo posteriormente os encéfalos submetidos aos procedimentos imunoistoquímicos detalhados a seguir.

Após sua remoção, os encéfalos foram mergulhados em fixador durante 4 horas e em seguida colocados em solução de sacarose a 30% em PBS (0,1 M) a 4°C . Após 48 horas, os encéfalos foram seccionados em cortes de 30 μm de espessura utilizando um criostato e coletados em PBS (0,01 M). Imediatamente após, foram realizados o bloqueio da peroxidase endógena (solução de H_2O_2 , 1%) por 30 minutos e os cortes foram lavados com PBS (0,01 M) 3 vezes por 5 minutos. Posteriormente, foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com albumina bovina 5% em 0,1 M de PBS durante uma hora.

Os cortes foram processados primeiro para imunorreatividade para c-Fos ficando incubados durante a noite com o anticorpo primário anti-fos de coelho (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) diluído 1:10.000 em PBS (0,1 M) contendo 2% de normal goat serum e 0.3% Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Após lavagem, os cortes foram incubados com segundo anticorpo biotilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA, diluído 1:200 em 1.5% de normal goat serum - PBS) seguido pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Elite, 1:200 em PBS) ambos por 1 hora a temperatura ambiente. Para coloração, foi empregado diaminobenzidina (DAB, Sigma - Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) intensificado com cloreto de cobalto 1% e sulfato de níquel 1%. O produto da reação conferiu uma coloração violeta escuro – preto ao núcleo (FLEMING; WALSH, 1994).

Para a dupla marcação, após a marcação para c-Fos, os cortes foram incubados por 48 horas a 4°C com anti-OT de coelho (Peninsula Laboratories, Inc., San Carlos, CA, USA,

1:20,000). Posteriormente, os cortes foram lavados e submetidos ao mesmo protocolo descrito para c-FOS utilizando anticorpo biotilado secundário apropriado seguido pelo complexo avidina-biotina-peroxidase. A cor marrom do citoplasma foi detectada por uma solução de DAB não intensificada.

Por último, os cortes foram montados utilizando Gelatina de Albrecht (1,5% gelatina/álcool 80%). As lâminas foram secas a temperatura ambiente, desidratadas com xileno e cobertas com Entellan.

As áreas hipotalâmicas em estudo, estria da lâmina terminal (BST: -0.72 mm posterior ao bregma), núcleo pré-óptico mediano dorsal (MnPOd: -0.12 mm posterior ao bregma) e ventral (MnPOv: -0.12 mm posterior ao bregma), núcleo paraventricular (PVN: -0.96 mm posterior ao bregma) e núcleo supraóptico (SON: -1.08 mm posterior ao bregma), foram identificadas e delimitadas de acordo com o atlas Paxinos e Watson (1997). As células imunorreativas para c-Fos foram contadas na BST e MnPOd e MnPOv. As células imunorreativas para c-Fos em neurônios ocitocinérgicos foram contadas no PVN e SON com auxílio de um microscópio Nikon modelo H55L. As imagens foram capturadas e o número de cortes representativos para cada grupo experimental foi de 4-6.

3.9 DROGAS UTILIZADAS

As drogas utilizadas nos experimentos foram dexametasona (Decadron, Aché, Brasil), lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*, metirapona, AM251 (antagonista CB1) e WIN 55,212-2 (agonista canabinóide). Exceto a dexametasona, todas as demais drogas foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co (EUA).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando um software GraphPad versão 3.0 e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação de duas médias foi aplicado o teste “t” de *Student*. Para comparação de três ou mais médias foi utilizado a análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de *Newman-Keuls*. Os resultados com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.



4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1 EFEITO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO MATERNO

Para a realização deste experimento foram utilizadas ratas no 6º ou 7º dia de lactação (n=7 por grupo). As ratas foram tratadas com salina (1 mL/Kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) via i.p. e a ninhada de 8 filhotes foi separada e colocada em uma caixa aquecida (~30°C). Após 2 horas, a ninhada foi recolocada na caixa moradia para o registro do CM que foi filmado durante 30 minutos.

4.2 EFEITO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO

Para a avaliação do CA, foram utilizadas ratas no 6º ou 7º dia de lactação (n=7 por grupo). As ratas foram tratadas com salina (1 mL/Kg) ou DEXA (1 mg/Kg) via i.p. e após 2 horas um rato macho, com peso inferior ao da lactante, foi colocado na caixa moradia do lado oposto do ninho. O CA foi filmado por 10 minutos para posterior análise.

4.3 EFEITO DA DEXAMETASONA NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO

Neste experimento foram utilizadas ratas não lactantes no período diestro e ratas lactantes no 6º ou 7º dia de lactação (n=8 por grupo). As ratas foram tratadas com salina (1 mL/Kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) via i.p. e após 2 horas foram submetidas ao teste do labirinto em T elevado. Após 30 segundos, foram colocadas individualmente na arena do campo aberto e filmadas por 5 minutos cada para posterior análise.

4.4 EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE O GANHO DE PESO DA NINHADA

Para a avaliação do ganho de peso da ninhada foram utilizados 6 ratas lactantes por grupo. A ninhada de 8 filhotes foi separada e colocada em uma caixa aquecida (~30°C) por um período total de 12 horas. Após 10 horas da separação maternal, as ratas foram tratadas com salina (1 mL/Kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) via i.p. e após 1 hora e 55 minutos foram tratadas com salina (1 mL/Kg) ou ocitocina (1 µg/Kg) via i.p. Antes da reintrodução dos filhotes, massageou-se manualmente a bexiga dos filhotes para eliminação de urina,

pesou-se a ninhada e a reintrodução dos filhotes foi feita após 5 minutos da administração de salina ou ocitocina. Quinze minutos após a rata expressar o comportamento materno total, a ninhada foi removida e pesada novamente para determinação do ganho de peso.

4.5 EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE OCITOCINA, PROLACTINA E CORTICOSTERONA

Neste experimento foram utilizadas ratas não lactantes no período diestro e ratas lactantes no 6º ou 7º dia de lactação (n=6 por grupo). Inicialmente a ninhada de 8 filhotes foi separada da mãe e colocada em uma caixa aquecida (~30°C) por um período total de 12 horas. As ratas foram tratadas com salina (1 mL/Kg; i.p.) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg; i.p.) 10 horas após a separação maternal. Após 2 horas dos tratamentos, a ninhada foi recolocada na caixa moradia e após 15 minutos a rata expressar o comportamento materno total, foram submetidas à decapitação e o sangue coletado para as dosagens hormonais de ocitocina, prolactina e corticosterona, utilizando-se a técnica de radioimunoensaio. Também foi coletado sangue de outros dois grupos de ratas: ratas não lactantes no período diestro e ratas lactantes, submetidas a 12 horas de separação, porém não expostas à ninhada (denominado como tempo 0).

4.6 EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE A ATIVAÇÃO DE c-Fos EM NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS

Ratas submetidas às mesmas manipulações do protocolo 4.1 foram anestesiadas com tribromoetanol (250 mg/Kg; i.p.) 1 hora e 30 minutos após o registro do CM, e em seguida perfundidas através de uma punção intracárdica com salina (250 mL) contendo 5000U/1 de heparina, seguido pela perfusão com fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (500 mL). Ao final, os encéfalos foram removidos, armazenados em paraformaldeído 4% por 4 horas, e posteriormente armazenados em solução de sacarose a 30% até a realização dos procedimentos imunoistoquímicos.

4.7 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA NO COMPORTAMENTO MATERNO: POSSÍVEL MEDIAÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES

Para a realização deste experimento foram utilizadas ratas no 6º ou 7º dia de lactação (n=8 por grupo). As ratas foram tratadas com salina (1 mL/Kg) ou metirapona (50 mg/Kg) 10 e 2 horas antes do tratamento com salina (1 mL/Kg) ou LPS (500 µg/Kg) via i.p. A ninhada de 8 filhotes foi separada e colocada em uma caixa aquecida (~30°C) e, após 2 horas, a ninhada foi recolocada na caixa moradia para o registro do CM que foi filmado durante 30 minutos.

4.8 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO: POSSÍVEL MEDIAÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES

Para a realização deste experimento foram utilizadas ratas no 6º ou 7º dia de lactação (n=8 por grupo). As ratas foram tratadas com salina (1 mL/Kg) ou metirapona (50 mg/Kg) 10 e 2 horas antes do tratamento com salina (1 mL/Kg) ou LPS (500 µg/Kg) via i.p. Após 2 horas, um rato macho com peso inferior ao da lactante, foi colocado na caixa moradia do lado oposto do ninho e o CA foi filmado por 10 minutos para posterior análise.

4.9 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO: POSSÍVEL MEDIAÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES

Para a realização deste experimento foram utilizadas ratas no 6º ou 7º dia de lactação (n=8 por grupo). As ratas foram tratadas com salina (1 mL/Kg) ou metirapona (50 mg/Kg) 10 e 2 horas antes do tratamento com salina (1 mL/Kg) ou LPS (500 µg/Kg) via i.p. Após 2 horas foram submetidas ao teste do labirinto em T elevado e após 30 segundos, foram colocadas individualmente na arena do campo aberto e filmadas por 5 minutos cada para posterior análise.

4.10 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE OCITOCINA, PROLACTINA E CORTICOSTERONA

Para a realização deste experimento foram utilizadas ratas no 6º ou 7º dia de lactação (n=6 por grupo). Inicialmente a ninhada de 8 filhotes foi separada da mãe e colocada em uma caixa aquecida (~30°C) por um período total de 12 horas. As ratas foram tratadas com salina (1 mL/Kg) ou metirapona (50 mg/Kg) 10 e 2 horas antes do tratamento com salina (1 mL/Kg) ou LPS (500 µg/Kg) via i.p. Após 2 horas, a ninhada foi recolocada na caixa moradia e após 15 minutos a rata expressar o comportamento materno total, foram submetidas à decapitação e o sangue coletado para as dosagens hormonais de ocitocina, prolactina e corticosterona, utilizando-se a técnica de radioimunoensaio.

4.11 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO MATERNO

Para a realização deste experimento foram utilizadas ratas no 6º ou 7º dia de lactação (n=8 por grupo). Inicialmente a ninhada de 8 filhotes foi separada da mãe e colocada em uma caixa aquecida (~30°C) por um período total de 12 horas. Após 10 horas de separação maternal, as ratas foram tratadas com salina (1 mL/Kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) e após 90 minutos foram tratadas com veículo (1 mL/Kg) ou AM251 (3 mg/Kg) via i.p. Após 30 minutos, a ninhada foi recolocada na caixa moradia para o registro do CM, que foi filmado por 30 minutos.

4.12 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO

Para avaliação do comportamento agressivo foram utilizadas ratas no 6º ou 7º dia de lactação (n=8 por grupo). As ratas foram tratadas com salina (1 mL/Kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) e após 90 minutos foram tratadas com veículo (1 mL/Kg) ou AM251 (3 mg/Kg) via i.p. Após 30 minutos, um rato macho com peso inferior ao da lactante, foi colocado na caixa moradia do lado oposto do ninho e o CA foi filmado por 10 minutos para posterior análise.

4.13 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO

Para a realização deste experimento foram utilizadas ratas no 6º ou 7º dia de lactação (n=8 por grupo). As ratas foram tratadas com salina (1 mL/Kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) e após 90 minutos foram tratadas com veículo (1 mL/Kg) ou AM251 (3 mg/Kg) via i.p. Após 30 minutos, foram submetidas ao teste do labirinto em T elevado e após 30 segundos, foram colocadas individualmente na arena do campo aberto e filmadas por 5 minutos cada para posterior análise.

4.14 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NA EXPRESSÃO DE c-Fos NA BST E MnPO E EM NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS NO PVN E SON

Ratas submetidas às mesmas manipulações do protocolo 4.11 foram anestesiadas com tribromoetanol (250 mg/Kg; i.p.) 1 hora e 30 minutos após o registro do CM, e em seguida perfundidas através de uma punção intracardíaca com salina (250 mL) contendo 5000U/l de heparina, seguido pela perfusão com fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (500 mL). Ao final, os encéfalos foram removidos, armazenados em paraformaldeído 4% por 4 horas, e posteriormente armazenados em solução de sacarose a 30% até a realização dos procedimentos imunistoquímicos.

4.15 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO GANHO DE PESO DA NINHADA

Para a avaliação do ganho de peso da ninhada, a ninhada de 8 filhotes foi separada e colocada em uma caixa aquecida (~30°C) por um período total de 12 horas. Após 10 horas da separação maternal, as ratas foram tratadas com salina (1 mL/Kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) e após 90 minutos foram tratadas com veículo (1 mL/Kg) ou AM251 (3 mg/Kg) via i.p. Após 30 minutos os filhotes foram reintroduzidos na caixa moradia. Antes da reintrodução dos filhotes, massageou-se manualmente a bexiga dos filhotes para eliminação

de urina e a ninhada foi pesada. Após 15 minutos de amamentação a ninhada foi pesada novamente para determinação do ganho de peso.

4.16 EFEITO DO WIN55,212-2 (AGONISTA DO RECEPTOR CB1) NO COMPORTAMENTO MATERNO

Para avaliar o efeito do WIN no CM, foram utilizadas ratas no 6º ou 7º dia de lactação (n=8 por grupo). Inicialmente a ninhada de 8 filhotes foi separada da mãe e colocada em uma caixa aquecida (~30°C) por um período total de 12 horas. Após 11 horas e 30 minutos de separação maternal, as ratas foram tratadas com veículo (1 mL/Kg), WIN (1 mg/Kg) ou WIN (3 mg/Kg) via i.p. Após 30 minutos, a ninhada foi recolocada na caixa moradia para o registro do CM que foi filmado por 30 minutos.

4.17 EFEITO DO WIN55,212-2 (AGONISTA DO RECEPTOR CB1) NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO

Para a avaliação do CA, foram utilizadas ratas no 6º ou 7º dia de lactação (n=8 por grupo). As ratas foram tratadas com veículo (1 mL/Kg), WIN (1 mg/Kg) ou WIN (3 mg/Kg) via i.p. e após 30 minutos um rato macho, com peso inferior ao da lactante, foi colocado na caixa moradia do lado oposto do ninho. O CA foi filmado por 10 minutos para posterior análise.

4.18 EFEITO DO WIN55,212-2 NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO

Para a realização deste experimento foram utilizadas ratas no 6º ou 7º dia de lactação (n=8 por grupo). As ratas foram tratadas com veículo (1 mL/Kg), WIN (1 mg/Kg) ou WIN (3 mg/Kg) via i.p. e após 30 minutos foram submetidas ao teste do labirinto em T elevado. Após 30 segundos, foram colocadas individualmente na arena do campo aberto e filmadas por 5 minutos cada para posterior análise.

4.19 EFEITO DO WIN55,212-2 NA EXPRESSÃO DE c-Fos NA BST E MNPO E EM NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS NO PVN E SON

Ratas submetidas às mesmas manipulações do protocolo 4.10 foram anestesiadas com tribromoetanol (250 mg/Kg; i.p.) 1 hora e 30 minutos após o registro do CM, e em seguida perfundidas através de uma punção intracardíaca com salina (250 mL) contendo 5000U/l de heparina, seguido pela perfusão com fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (500 mL). Ao final, os encéfalos foram removidos, armazenados em paraformaldeído 4% por 4 horas, e posteriormente armazenados em solução de sacarose a 30% até a realização dos procedimentos imunoistoquímicos.

4.20 EFEITO DO WIN55,212-2 SOBRE O GANHO DE PESO DA NINHADA

Para a avaliação do ganho de peso da ninhada, a ninhada de 8 filhotes foi separada e colocada em uma caixa aquecida (~30°C) por um período total de 12 horas. Após 11 horas e 30 minutos da separação maternal, as ratas (n=6 por grupo) foram tratadas com veículo (1 mL/Kg), WIN (1 mg/Kg) ou WIN (3 mg/Kg) via i.p. e após 30 minutos os filhotes foram reintroduzidos na caixa moradia. Antes da reintrodução dos filhotes, massageou-se manualmente a bexiga dos filhotes para eliminação de urina e a ninhada foi pesada. Após 15 minutos de amamentação a ninhada foi pesada novamente para determinação do ganho de peso.



5. RESULTADOS

5.1 EFEITO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO MATERNO

A análise do CM mostrou que o tratamento com dexametasona em ratas lactantes prejudicou a construção do ninho, pois as ratas demoraram mais tempo para agrupar os filhotes e não montaram o ninho completo (Figura 4A). A administração de dexametasona também aumentou a latência para a rata pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho ($p < 0,01$; Figura 4B), diminuiu o tempo de *licking pups* ($p < 0,001$; Figura 4C), não interferiu na porcentagem de permanência sobre os filhotes (Figura 4D), diminuiu a porcentagem de permanência na posição de cifose ($p < 0,001$; Figura 4E) e diminuiu a porcentagem de comportamento materno total ($p < 0,01$; Figura 4F). Com relação aos parâmetros não maternais, o tratamento com dexametasona aumentou o número de *rearings* ($p < 0,001$; Figura 4G) e o tempo de *self-grooming* ($p < 0,05$; Figura 4H).

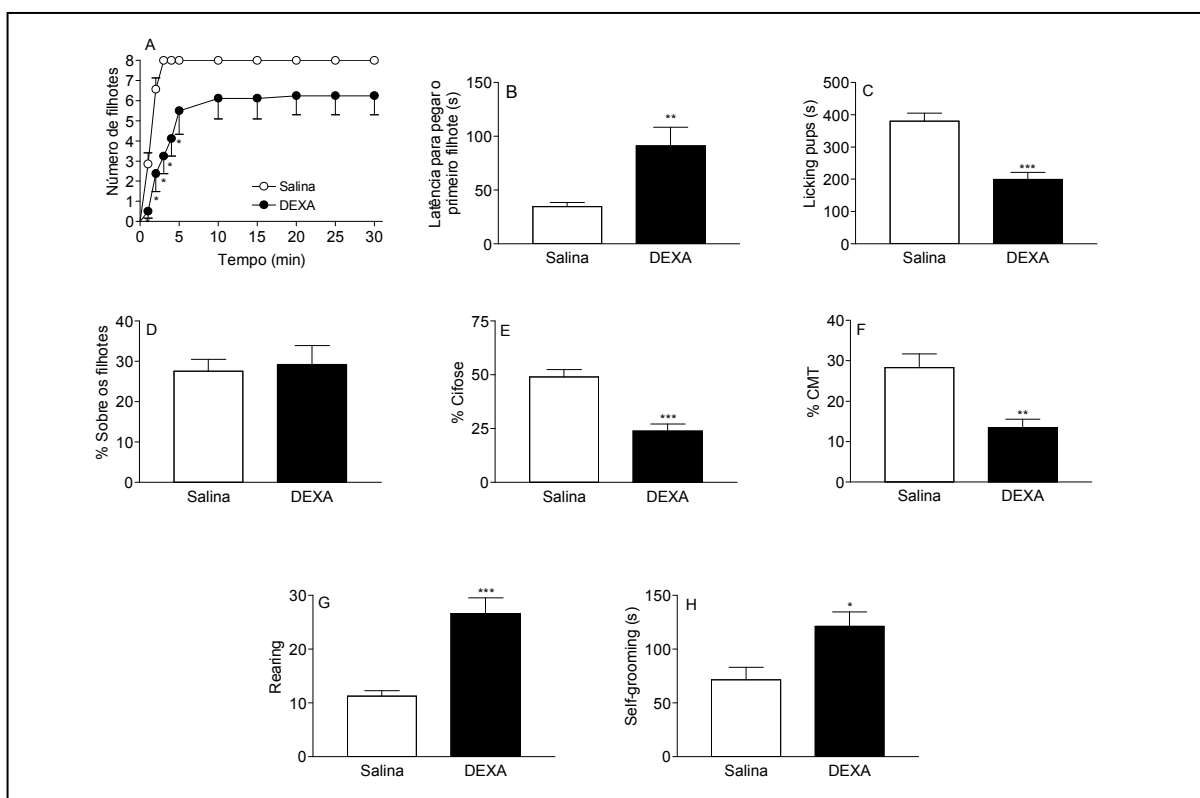


Figura 4: Efeito da administração de salina (1 mL/kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) em ratas lactantes, sobre a construção do ninho (A), latência em segundos para a rata pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho (B), tempo em segundos de *licking pups* (C), porcentagem de permanência sobre os filhotes (D), porcentagem de permanência na posição de cifose (E), porcentagem de comportamento materno total (F), número de *rearings* (G) e tempo em segundos de *self-grooming* (H). Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com as ratas tratadas com salina.

5.2 EFEITO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO

A administração de dexametasona em ratas lactantes aumentou a latência para o primeiro ataque ($p < 0,05$; Figura 5A), diminuiu o número de ataque frontal ($p < 0,001$; Figura 5B), diminuiu o número de ataque lateral ($p < 0,05$; Figura 5C), diminuiu o número de ameaça lateral ($p < 0,01$; Figura 5D), diminuiu o número de mordidas ($p < 0,01$; Figura 5E), não alterou o tempo em segundos de *self-grooming* (Figura 5F) e diminuiu o comportamento maternal em segundos ($p < 0,001$; Figura 5G).

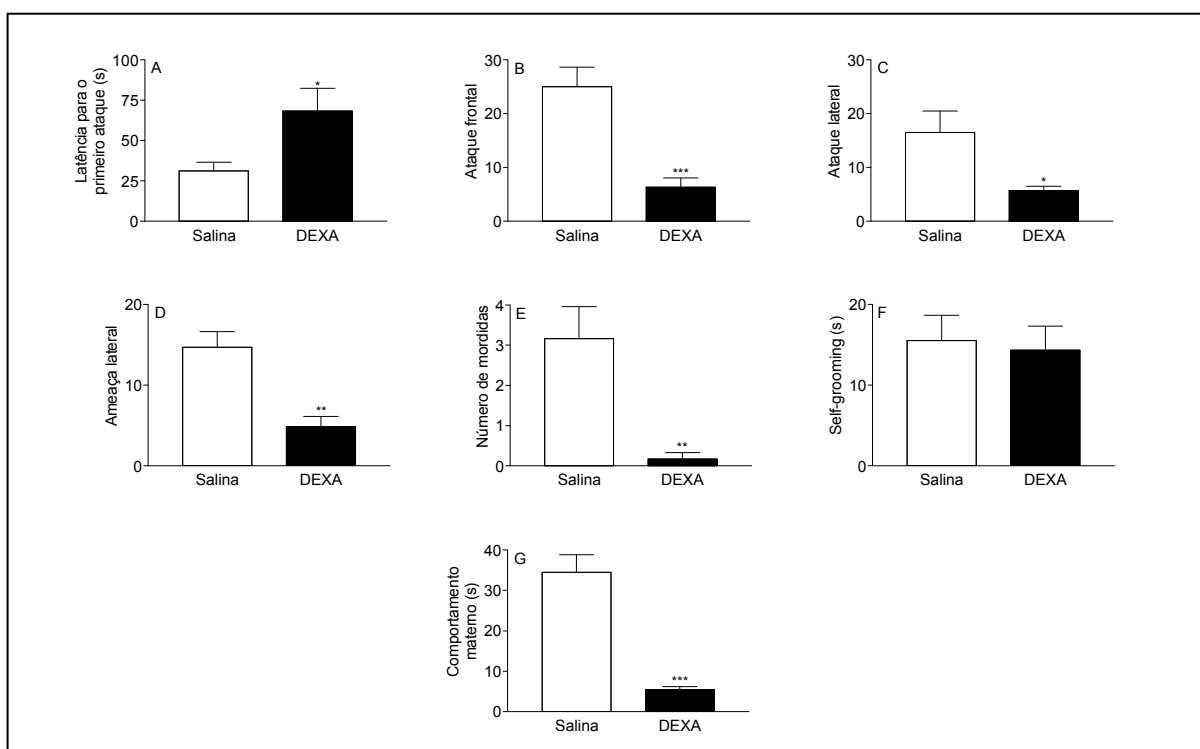


Figura 5: Efeito da administração de salina (1ml/kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) sobre a latência em segundos para o primeiro ataque (A), número de ataque frontal (B), número de ataque lateral (C), número de ameaça lateral (D), número de mordidas (E), tempo em segundos de *self-grooming* (F) e comportamento maternal em segundos (G). Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com as ratas tratadas com salina.

5.3 EFEITO DA DEXAMETASONA NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO

Na figura 6A pode-se observar que as ratas lactantes tratadas com veículo tiveram as latências de linha base, esquiua 1 e esquiua 2 diminuídas ($p < 0,05$) quando comparadas com ratas não lactantes. As ratas lactantes tratadas com dexametasona tiveram um aumento na latência de linha base ($p < 0,05$), esquiua 1 ($p < 0,01$) e esquiua 2 ($p < 0,05$) quando comparadas

as ratas lactantes tratadas com salina. Não houve diferença significativa entre as ratas não lactantes tratadas com dexametasona ou salina.

Com relação à latência para fuga (Figura 6B), ratas lactantes tratadas com salina tiveram um aumento nesse parâmetro ($p < 0,05$) quando comparadas com as ratas não lactantes. Não houve diferença significativa entre as ratas não lactantes tratadas com dexametasona ou salina, todavia as ratas lactantes tratadas com dexametasona tiveram uma diminuição na latência para fuga ($p < 0,05$) quando comparadas com as ratas lactantes tratadas com salina.

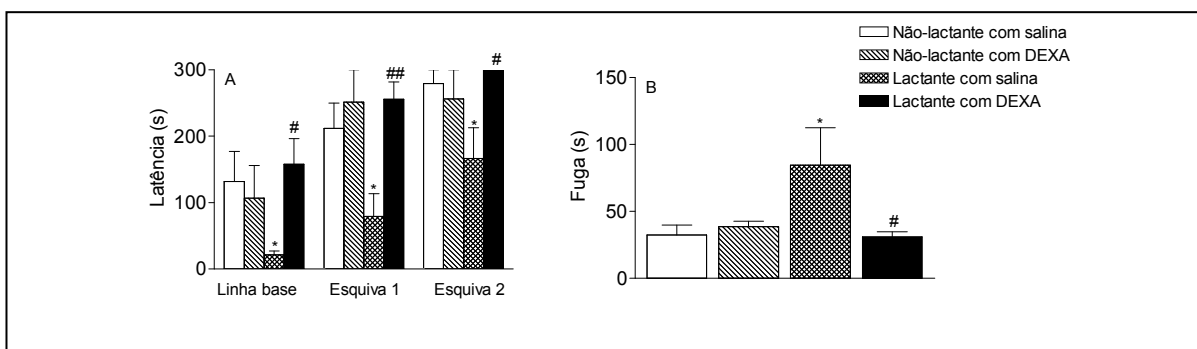


Figura 6: Efeito da dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) ou salina (1 mL/kg) sobre a latência em segundos para linha base, esquina 1 e esquina 2 (A) e, latência em segundos para fuga (B) em ratas não lactantes e lactantes no labirinto em T elevado. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com as ratas não lactantes. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ quando comparado com as ratas lactantes tratadas com salina.

Com relação ao teste do campo aberto, pode-se observar que não houve diferença significativa entre os grupos no número de entradas na periferia e no total de entradas (Figura 7A e 7C respectivamente). Porém, foi observado, em ratas lactantes tratadas com salina, um aumento no número de entradas no centro ($p < 0,001$; Figura 7B) e conseqüentemente na razão de entradas no centro sobre o total de entradas ($p < 0,001$; Figura 7D) quando comparadas as ratas não lactantes. O tratamento com dexametasona reverteu esse efeito, ou seja, as ratas lactantes tratadas com dexametasona tiveram uma diminuição no número de entradas no centro ($p < 0,001$; Figura 7B) e conseqüentemente na razão de entradas no centro sobre o total de entradas ($p < 0,001$; Figura 7D) quando comparadas as ratas lactantes tratadas com salina.

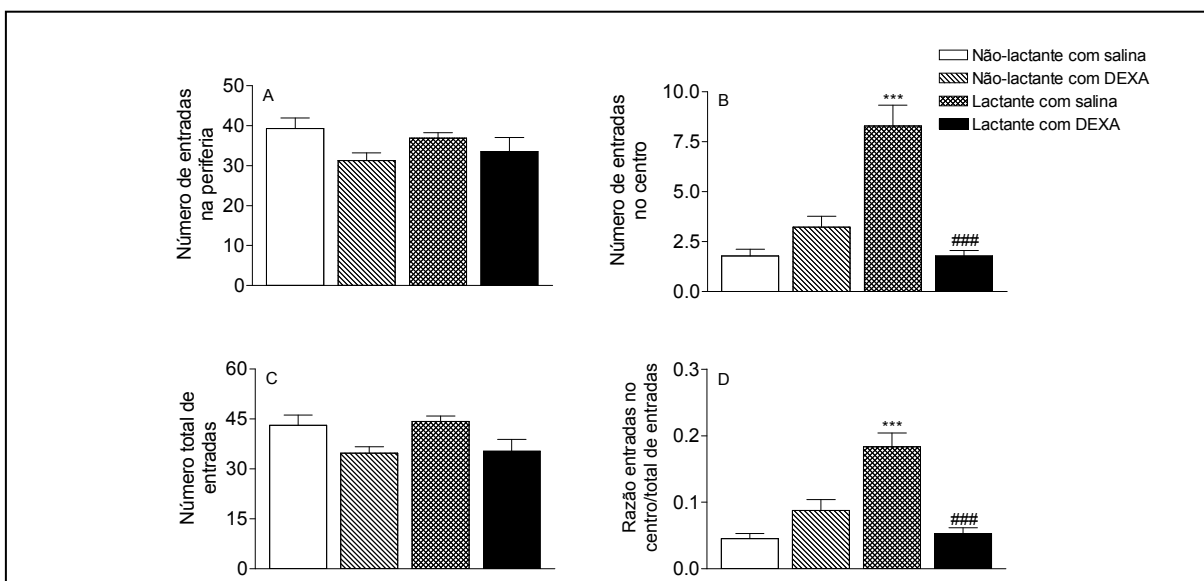


Figura 7: Efeito da dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) ou salina (1 mL/kg) sobre o número de entradas na periferia (A), número de entradas no centro (B), número total de entradas (C) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (D) em ratas não lactantes e lactantes no campo aberto. Valores expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ quando comparado com as ratas não lactantes. ### $p < 0,001$ quando comparado com as ratas lactantes tratadas com salina.

5.4 EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE O GANHO DE PESO DA NINHADA

O tratamento com a dexametasona promoveu uma diminuição no ganho de peso da ninhada quando comparado com as ratas que foram tratadas com salina ($p < 0,05$; $p < 0,001$; Figura 8) após tratamento com veículo ou ocitocina respectivamente. No entanto, a administração de ocitocina aumentou o ganho de peso da ninhada das mães que foram pré-tratadas com dexametasona ($p < 0,05$; Figura 8) quando comparadas com as ratas que foram pré-tratadas com dexametasona após a administração de veículo.

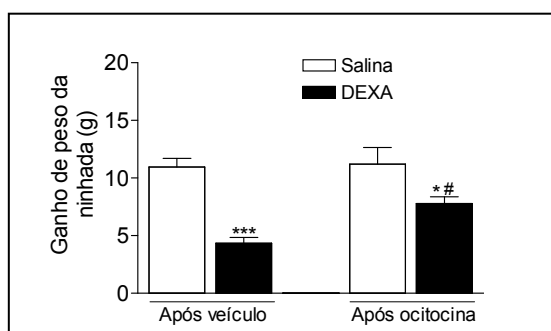


Figura 8: Efeito do tratamento com veículo (1 mL/Kg) ou ocitocina (1 μ g/Kg) sobre o ganho de peso da ninhada em gramas em ratas tratadas com salina (1 mL/kg) ou com dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg). Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ quando comparado com as ratas lactantes pré-tratadas com salina. # $p < 0,05$ quando comparado com as ratas lactantes pré-tratadas com dexametasona e veículo.

5.5 EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE OCITOCINA, PROLACTINA E CORTICOSTERONA

Após 15 minutos de permanência em posição de cifo, houve um aumento nos níveis plasmáticos de ocitocina e prolactina ($p < 0,05$; Figura 9A e 9B respectivamente) nas ratas lactantes tratadas com salina quando comparadas com as ratas lactantes não expostas a ninhada (tempo 0 minuto). O tratamento com dexametasona reduziu os níveis de ocitocina e prolactina ($p < 0,05$; Figura 9A e 9B respectivamente) nas ratas durante a lactação quando comparadas com as lactantes tratadas com salina após 15 minutos as ratas expressarem o comportamento materno total. Houve um aumento na secreção de corticosterona apenas após 15 minutos de permanência em posição de cifo. O tratamento com dexametasona não alterou os níveis de ocitocina e prolactina nas ratas que não foram expostas a ninhada, todavia a dexametasona reduziu a secreção de corticosterona em ratas não lactantes e lactantes ($p < 0,05$; Figura 9C) quando comparadas as ratas tratadas com salina.

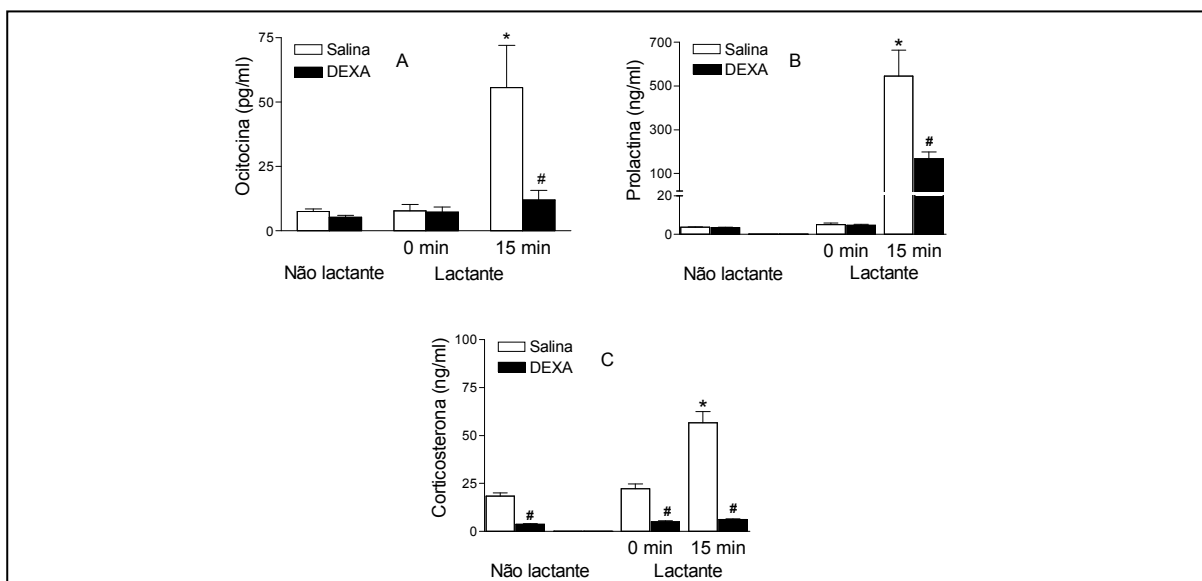


Figura 9: Efeito da dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) ou salina (1 mL/Kg) sobre os níveis plasmáticos de ocitocina (A), prolactina (B) e corticosterona (C) em ratas não lactantes e lactantes. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com as ratas lactantes no tempo 0 minuto. # $p < 0,05$ quando comparado com as ratas lactantes tratadas com dexametasona após 15 minutos de permanência em comportamento materno total.

5.6 EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE A ATIVAÇÃO DE c-Fos EM NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS

Após separação maternal de 2 horas, não foi observado marcação para c-Fos em neurônios ocitocinérgicos de ratas lactantes (dados não mostrados).

5.7 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HHA) NO COMPORTAMENTO MATERNO: POSSÍVEL MEDIAÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES

A análise do CM mostrou que o tratamento com veículo + LPS em ratas lactantes prejudicou a construção do ninho, pois as ratas demoraram mais tempo para agrupar os filhotes e não montaram o ninho completo (Figura 10A), quando comparado com o grupo veículo + salina. A administração de veículo + LPS também aumentou a latência para a rata pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho ($p < 0,05$; Figura 10B), diminuiu o tempo de *licking pups* ($p < 0,001$; Figura 10C), não interferiu na porcentagem de permanência sobre os filhotes (Figura 10D), diminuiu a porcentagem de permanência na posição de cifose ($p < 0,001$; Figura 10E) e diminuiu a porcentagem de comportamento materno total ($p < 0,01$; Figura 10F). Com relação aos parâmetros não maternais, o tratamento com veículo + LPS aumentou o número de *rearings* ($p < 0,05$; Figura 10G) e o tempo de *self-grooming* ($p < 0,05$; Figura 10H) quando comparado com as ratas tratadas com veículo + salina. O pré-tratamento com metirapona nas ratas tratadas com LPS reverteu parte dos efeitos produzidos pelo LPS, pois aumentou o tempo de *licking pups* ($p < 0,01$; Figura 10C), aumentou a porcentagem de permanência na posição de cifose ($p < 0,001$; Figura 10E), aumentou a porcentagem de comportamento materno total ($p < 0,001$; Figura 10F) e diminuiu o número de *rearings* ($p < 0,01$; Figura 10G) quando comparado com as ratas tratadas com veículo + LPS. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com veículo + salina e metirapona + salina.

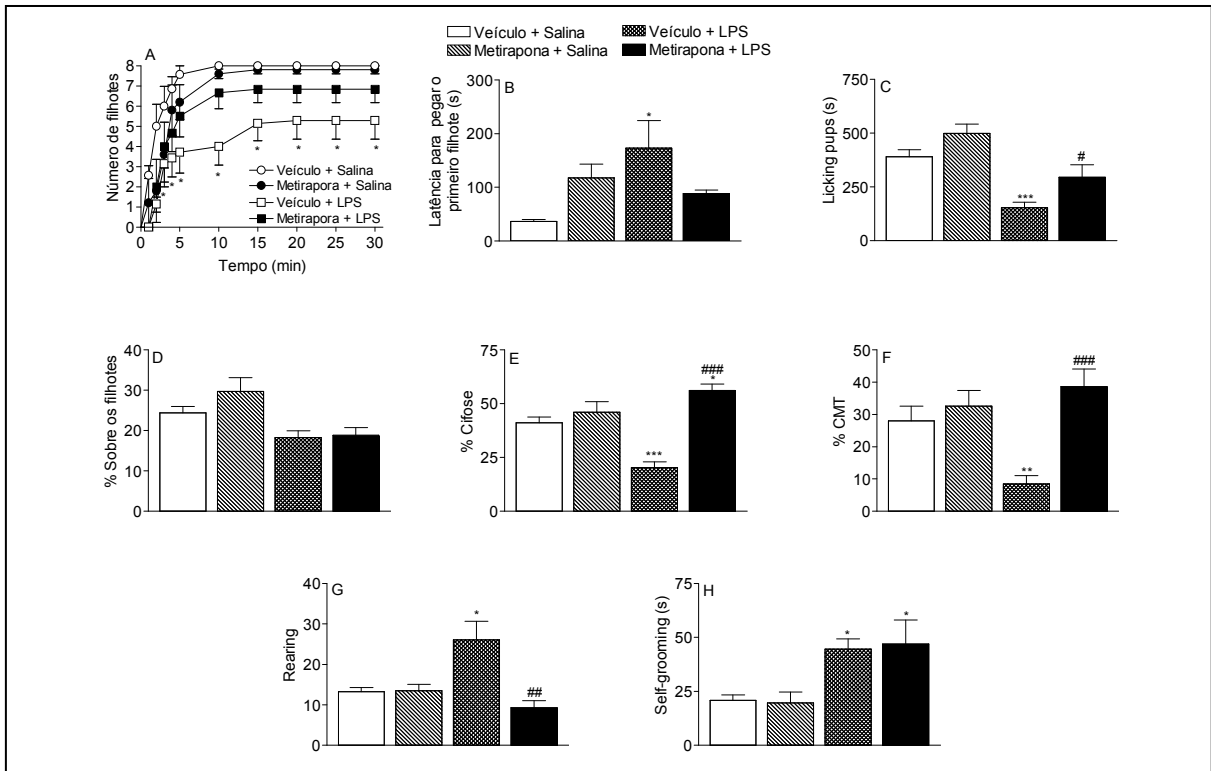


Figura 10: Efeito do pré-tratamento com veículo (1 mL/Kg) ou metirapona (2 x 50 mg/Kg) em ratas lactantes tratadas com veículo (1 mL/Kg) ou LPS (500 µg/Kg) sobre a construção do ninho (A), latência em segundos para a rata pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho (B), tempo em segundos de *licking pups* (C), porcentagem de permanência sobre os filhotes (D), porcentagem de permanência na posição de cifose (E), porcentagem de comportamento materno total (F), número de *rearings* (G) e tempo em segundos de *self-grooming* (H). Valores expressos como média ± EPM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 quando comparado com as ratas tratadas com veículo + salina. #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 quando comparado com as ratas tratadas com veículo + LPS.

5.8 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO: POSSÍVEL MEDIAÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES

A administração de veículo + LPS em ratas lactantes aumentou a latência para o primeiro ataque ($p<0,01$; Figura 11A), diminuiu o número de ataque frontal ($p<0,001$; Figura 11B), diminuiu o número de ataque lateral ($p<0,001$; Figura 11C), diminuiu o número de ameaça lateral ($p<0,001$; Figura 11D), não alterou o tempo em segundos de *self-grooming* (Figura 11E) e comportamento materno (Figura 11F) quando comparado com as ratas tratadas com veículo + salina. O tratamento com metirapona + salina aumentou somente o número de ameaça lateral ($p<0,01$; Figura 11D) quando comparado com as ratas tratadas com veículo + LPS. As ratas que foram tratadas com metirapona + salina tiveram a latência para o primeiro ataque aumentada ($p<0,01$; Figura 11A), o número de ataque frontal ($p<0,001$; Figura 11B), o número de ataque lateral ($p<0,001$; Figura 11C) e o número de ameaça lateral

($p < 0,001$; Figura 11D) diminuídos quando comparados as ratas tratadas com veículo + salina. Não houve alteração no tempo de *self-grooming* (Figura 11E) e comportamento maternal entre os diferentes grupos em estudo.

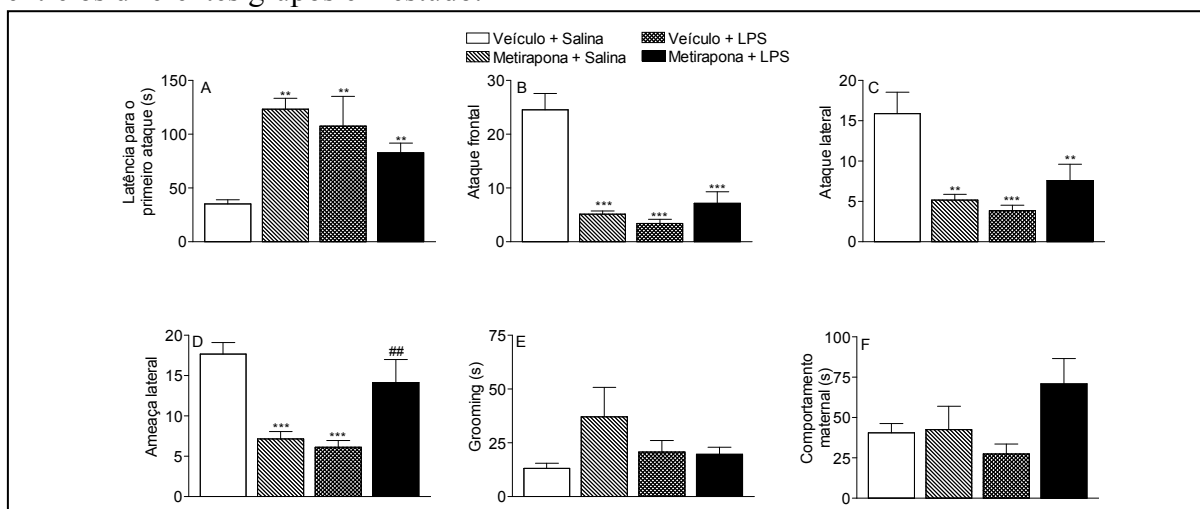


Figura 11: Efeito do pré-tratamento com veículo (1 mL/Kg) ou metirapona (2 x 50 mg/Kg) em ratas lactantes tratadas com veículo (1 mL/Kg) ou LPS (500 µg/Kg) sobre a latência em segundos para o primeiro ataque (A), número de ataque frontal (B), número de ataque lateral (C), número de ameaça lateral (D), número de mordidas (E), tempo em segundos de *self-grooming* (F) e comportamento maternal em segundos (G). Valores expressos como média ± EPM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com as ratas tratadas com veículo + salina. ## $p < 0,01$ quando comparado com as ratas tratadas com veículo + LPS.

5.9 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO: POSSÍVEL MEDIAÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES

Na figura 12A pode-se observar que as ratas tratadas com veículo + LPS tiveram as latências de linha base e esquiua 1 ($p < 0,05$) aumentadas quando comparadas com as ratas tratadas com veículo + salina. No entanto, as ratas que foram pré-tratadas com metirapona + LPS tiveram esses parâmetros revertidos ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo veículo + LPS. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com veículo + salina e metirapona + salina.

Com relação à latência para fuga (Figura 12B), não houve diferença significativa entre os diferentes grupos.

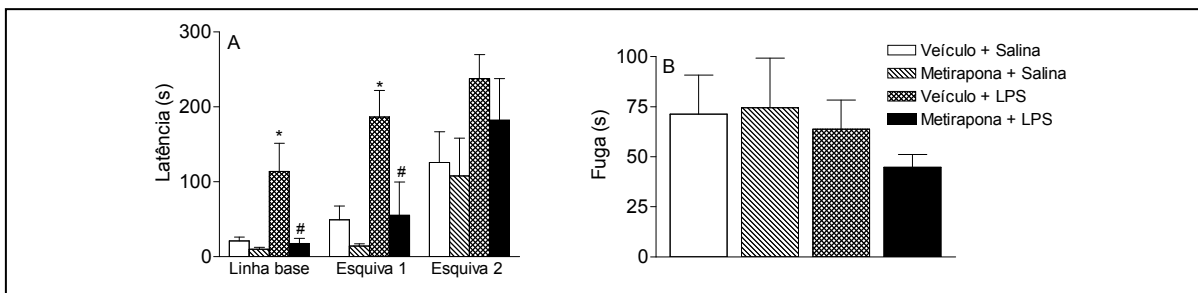


Figura 12: Efeito do pré-tratamento com veículo (1 mL/Kg) ou metirapona (2 x 50 mg/Kg) em ratas lactantes tratadas com veículo (1 mL/Kg) ou LPS (500 µg/Kg) sobre a latência em segundos para linha base, esquina 1 e esquina 2 (A) e, latência em segundos para fuga (B) em ratas lactantes no labirinto em T elevado. Valores expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com as ratas tratadas com veículo + salina. # $p < 0,05$ quando comparado com as ratas tratadas com veículo + LPS.

Com relação ao teste do campo aberto, pode-se observar que o tratamento com veículo + LPS diminui o número de entradas na periferia ($p < 0,001$; Figura 13A), no centro ($p < 0,001$; Figura 13B), o total de entradas ($p < 0,001$; Figura 13C) e a razão de entradas no centro sobre o total de entradas ($p < 0,01$; Figura 13D) quando comparado as ratas tratadas com veículo + salina. O mesmo ocorreu com as ratas que foram tratadas com metirapona e LPS, ou seja, houve uma diminuição no número de entradas na periferia ($p < 0,001$; Figura 13A), no centro ($p < 0,001$; Figura 13B), no total de entradas ($p < 0,001$; Figura 13C) e na razão de entradas no centro sobre o total de entradas ($p < 0,01$; Figura 13D) quando comparado as ratas tratadas com veículo + salina. Porém, as ratas tratadas com metirapona + LPS tiveram o número de entradas na periferia ($p < 0,05$; Figura 13A) e o número total de entradas ($p < 0,05$; Figura 13C) aumentado quando comparado com as ratas que receberam veículo + LPS.

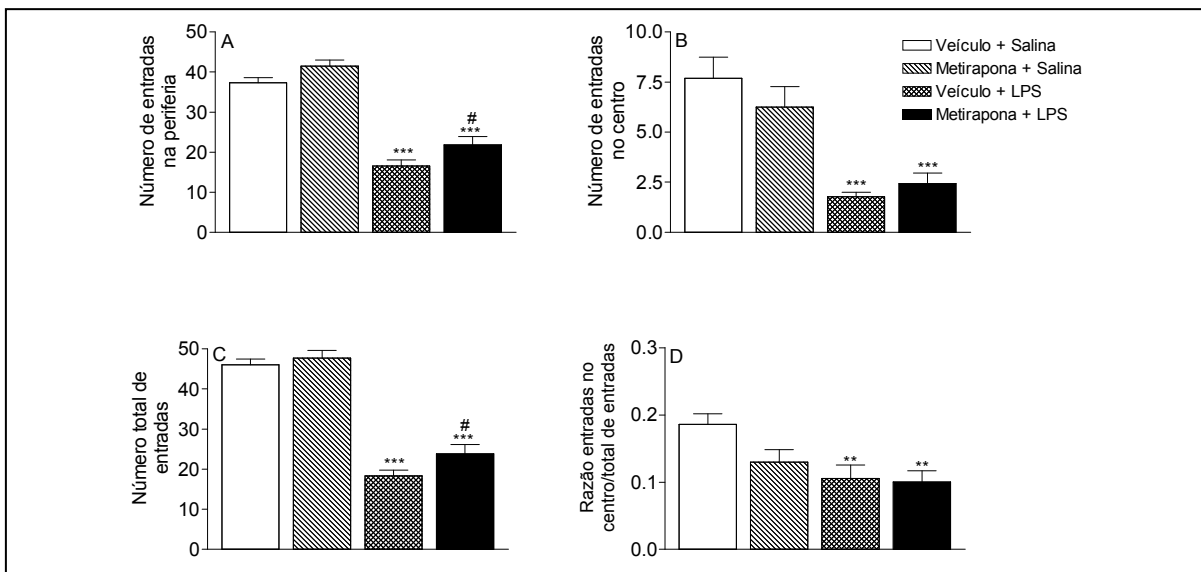


Figura 13: Efeito do pré-tratamento com veículo (1 mL/Kg) ou metirapona (2 x 50 mg/Kg) em ratas lactantes tratadas com veículo (1 mL/Kg) ou LPS (500 µg/Kg) sobre o número de entradas na periferia (A), número de entradas no centro (B), número total de entradas (C) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (D) em ratas lactantes no campo aberto. Valores expressos como média ± EPM. **p<0,01; ***p<0,001 quando comparado com as ratas tratadas com veículo + salina. #p<0,05 quando comparado com as ratas tratadas com veículo + LPS.

5.10 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE OCITOCINA, PROLACTINA E CORTICOSTERONA

Após 15 minutos de permanência em comportamento materno total, houve uma diminuição nos níveis plasmáticos de ocitocina e prolactina (p<0,05; Figura 14A e 14B respectivamente) e um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona (p<0,05; Figura 14C) nas ratas tratadas com veículo + LPS quando comparadas com as ratas tratadas com veículo + salina. O tratamento com metirapona + LPS reverteu esse efeito, ou seja, aumentou os níveis de ocitocina e prolactina (p<0,05; Figura 14A e 14B respectivamente) e diminuiu os níveis de corticosterona (p<0,05; Figura 14C) quando comparado com as ratas que foram tratadas com veículo + LPS.

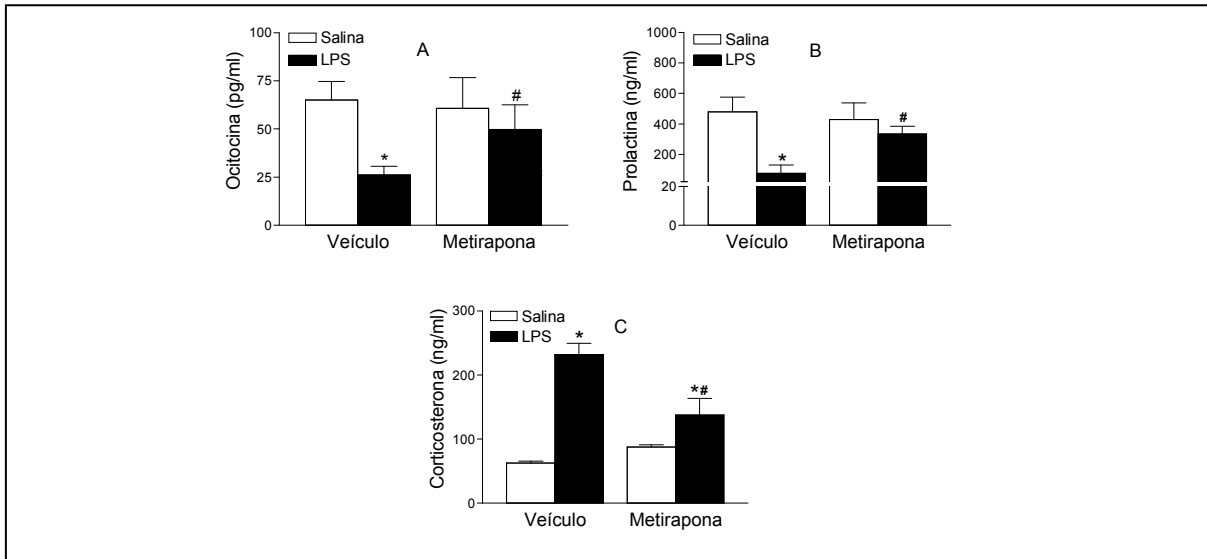


Figura 14: Efeito do pré-tratamento com veículo (1 mL/Kg) ou metirapona (2 x 50 mg/Kg) em ratas lactantes tratadas com veículo (1 mL/Kg) ou LPS (500 µg/Kg) sobre os níveis plasmáticos de ocitocina (A), prolactina (B) e corticosterona (C) em ratas lactantes. Valores expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com as ratas tratadas com veículo + salina. # $p < 0,05$ quando comparado com as ratas tratadas com veículo + LPS.

5.11 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO MATERNO

Após separação maternal de 12 horas, o tratamento com dexametasona em ratas lactantes prejudicou a construção do ninho, pois as ratas demoraram mais tempo para agrupar os filhotes e não montaram o ninho completo (Figura 15A). A administração de dexametasona também aumentou a latência para a rata pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho ($p < 0,05$; Figura 15B), diminuiu o tempo de *licking pups* ($p < 0,01$; Figura 15C), não interferiu na porcentagem de permanência sobre os filhotes (Figura 15D), diminuiu a porcentagem de permanência na posição de cifose ($p < 0,05$; Figura 15E) e diminuiu a porcentagem de comportamento materno total ($p < 0,5$; Figura 15F). Com relação aos parâmetros não maternos, o tratamento com dexametasona não alterou o número de *rearings* (Figura 15G) e aumentou o tempo de *self-grooming* ($p < 0,05$; Figura 15H).

O tratamento com AM251 não alterou nenhum parâmetro comportamental em ratas pré-tratadas com salina, mas reverteu os efeitos promovidos pela dexametasona, uma vez, que as ratas que foram tratadas com DEXA + AM251 tiveram a latência para a rata pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho diminuída ($p < 0,05$; Figura 15B), o tempo de *licking pups* ($p < 0,05$; Figura 15C), a porcentagem de permanência na posição de cifose ($p < 0,05$; Figura

15E) e a porcentagem de comportamento materno total ($p < 0,5$; Figura 15F) aumentados quando comparados as ratas que foram tratadas com DEXA + veículo.

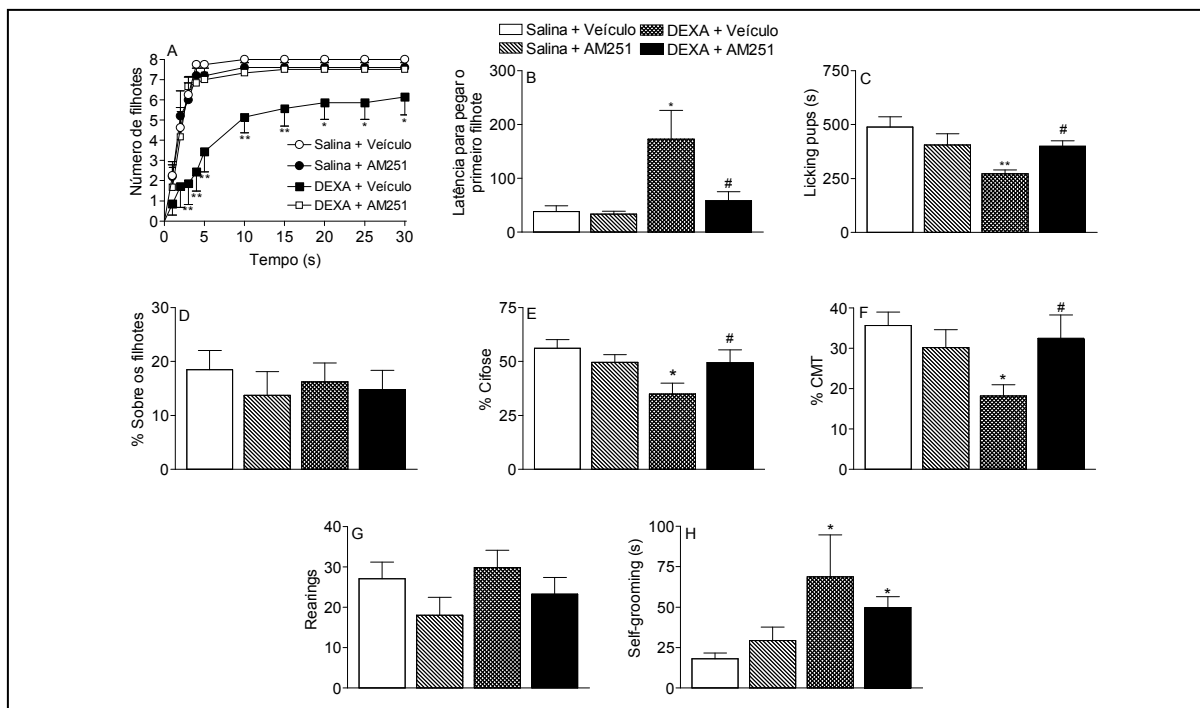


Figura 15: Efeito do tratamento com antagonista do receptor CB1 (AM251; 3 mg/kg) em ratas lactantes pré-tratadas com salina (1 mL/kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) sobre a construção do ninho (A), latência em segundos para a rata pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho (B), tempo em segundos de *licking pups* (C), porcentagem de permanência sobre os filhotes (D), porcentagem de permanência na posição de cifose (E), porcentagem de comportamento materno total (F), número de *rearings* (G) e tempo em segundos de *self-grooming* (H). Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparado com as ratas tratadas com salina + veículo. # $p < 0,05$ quando comparado com as ratas tratadas com DEXA + veículo.

5.12 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO

A administração de dexametasona em ratas lactantes aumentou a latência em segundos para o primeiro ataque ($p < 0,01$; Figura 16A), diminuiu o número de ataque frontal ($p < 0,05$; Figura 16B), diminuiu o número de ameaça lateral ($p < 0,05$; Figura 16D) e diminuiu o tempo em segundos de comportamento materno ($p < 0,05$; Figura 16F) quando comparado com as ratas tratadas com salina + veículo. O AM251 reverteu o efeito promovido pela dexametasona uma vez que as ratas que foram tratadas com DEXA + AM251 tiveram a latência para o primeiro ataque diminuída, o número de ataque frontal, ameaça lateral e comportamento materno aumentado ($p < 0,05$; Figura 16A, B, D e F respectivamente) quando comparadas com as ratas tratadas com DEXA + veículo. A administração de AM251 em ratas lactantes pré-tratadas com salina não provocou alteração em nenhum parâmetro comportamental analisado.

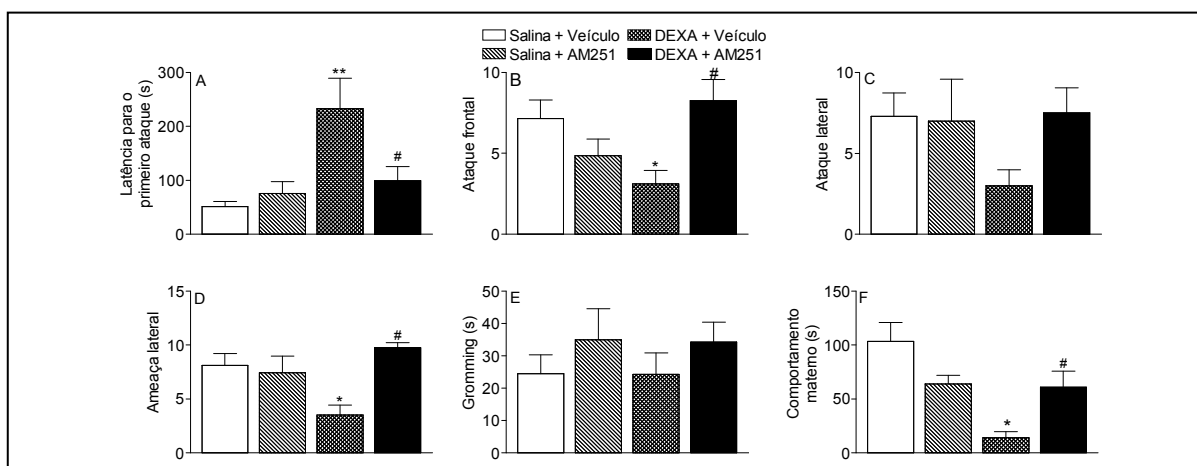


Figura 16: Efeito do tratamento com antagonista do receptor CB1 (AM251; 3 mg/kg) em ratas lactantes pré-tratadas com salina (1 mL/kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) sobre a latência em segundos para o primeiro ataque (A), número de ataque frontal (B), número de ataque lateral (C), número de ameaça lateral (D), número de mordidas (E), tempo em segundos de *self-grooming* (F) e comportamento materno em segundos (G). Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparado com as ratas tratadas com salina + veículo. # $p < 0,05$ quando comparado com as ratas tratadas com DEXA + veículo.

5.13 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO

Na figura 17A pode-se observar que as ratas lactantes tratadas com DEXA + veículo tiveram um aumento na latência de linha base ($p < 0,01$), esquiva 1 ($p < 0,001$) e esquiva 2 ($p < 0,01$) quando comparadas com as ratas lactantes tratadas com salina + veículo. O AM251 quando administrado após a dexametasona reverteu parte dos efeitos produzidos pela dexametasona, pois diminuiu a latência de linha base ($p < 0,01$) e esquiva 1 ($p < 0,01$) quando comparadas com as ratas que foram tratadas com DEXA + veículo. Ainda com relação a esses parâmetros, não houve diferença significativa entre as ratas tratadas com salina + veículo e salina + AM251.

Com relação à latência para fuga (Figura 17B), tanto as ratas tratadas com DEXA + veículo como as ratas tratadas salina + AM251 tiveram uma diminuição na latência para fuga ($p < 0,05$) quando comparadas com as ratas lactantes tratadas com salina + veículo. O AM251 quando administrado após a dexametasona, reverteu esse efeito ($p < 0,01$), sem alterar tais parâmetros em ratas tratadas com salina.

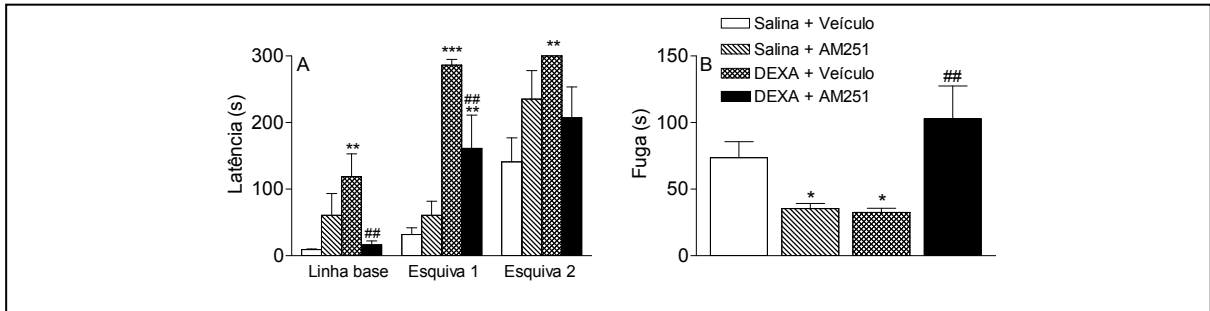


Figura 17: Efeito do tratamento com antagonista do receptor CB1 (AM251; 3 mg/kg) em ratas lactantes pré-tratadas com salina (1 mL/kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) sobre a latência em segundos para linha base, esquina 1 e esquina 2 (A) e, latência em segundos para fuga (B) em lactantes no labirinto em T elevado. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com as ratas tratadas com salina + veículo. ## $p < 0,01$ quando comparado com as ratas tratadas com DEXA + veículo.

No teste do campo aberto, pode-se observar que a dexametasona reduziu o número de entradas no centro ($p < 0,01$; Figura 18B) e a razão de entradas no centro sobre o total de entradas ($p < 0,001$; Figura 18D) quando comparado com as ratas tratadas com salina + veículo. O tratamento com AM251 reverteu esse efeito ($p < 0,05$; Figura 18B e 18D) quando comparado com as ratas tratadas com DEXA + veículo. O tratamento com AM251 não alterou o número de entradas no centro, na periferia, total de entradas de ratas tratadas com salina. Não houve alteração no número de entradas na periferia e no número total de entradas nos diferentes grupos.

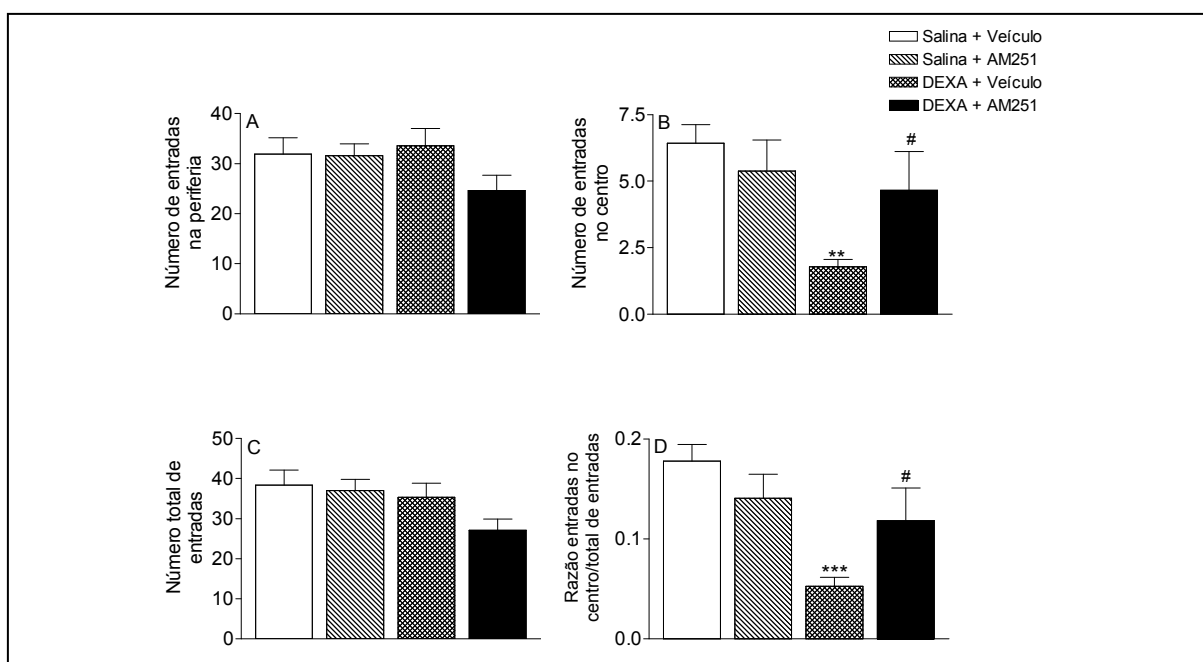


Figura 18: Efeito do tratamento com antagonista do receptor CB1 (AM251; 3 mg/kg) em ratas lactantes pré-tratadas com salina (1 mL/kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) sobre o número de entradas na periferia (A), número de entradas no centro (B), número total de entradas (C) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (D) em ratas lactantes no campo aberto. Valores expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com as ratas tratadas com salina + veículo. # $p < 0,05$ quando comparado com as ratas tratadas com DEXA + veículo.

5.14 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NA EXPRESSÃO DE c-Fos NA BST E MnPO E EM NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS NO PVN E SON

Na figura 19 pode-se observar que o tratamento com DEXA + veículo diminuiu o número de células positivas para c-Fos na BST (Figura 19A; $p < 0,001$), no MnPOd (Figura 19B; $p < 0,05$) e no MnPOv (Figura 19C; $p < 0,05$) quando comparado com as ratas que foram tratadas com salina + veículo. O tratamento com AM251 reverteu o efeito da dexametasona, ou seja, as ratas que foram tratadas com DEXA + AM251 tiveram o número de células positivas para c-Fos na BST (Figura 19A; $p < 0,01$), no MnPOd (Figura 19B; $p < 0,05$) e no MnPOv (Figura 19C; $p < 0,05$) aumentados quando comparados com o grupo DEXA + veículo, sem alterar o número de c-Fos no BST, MnPOd e MnPOv de ratas tratadas com salina.

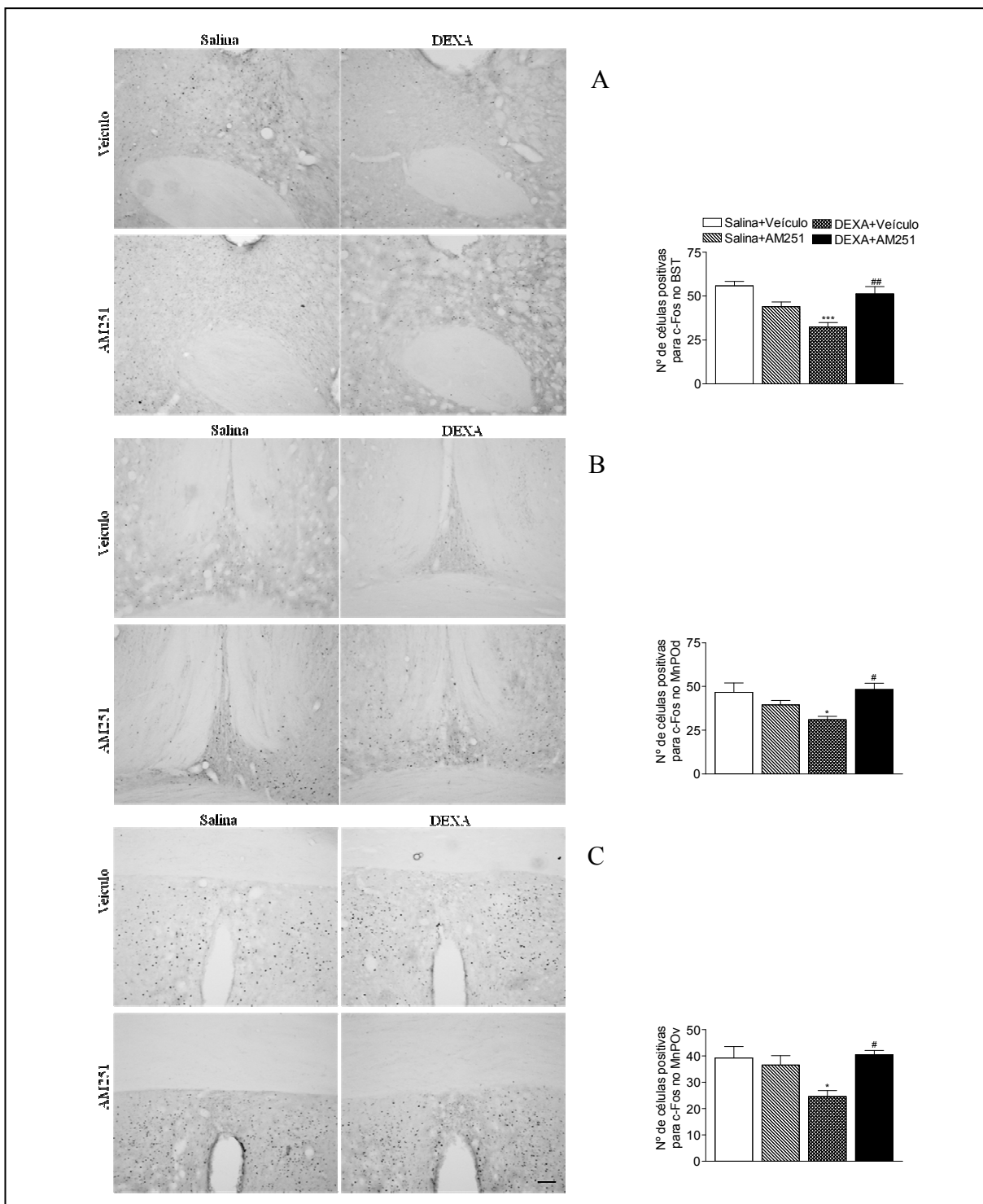


Figura 19: Fotomicrografias representativas (10x) de cortes de encéfalos mostrando células positivas para c-Fos na BST (A), MnPOd (B) e MnPOv (C) em ratas lactantes pré-tratadas com salina (1 mL/Kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) seguido pelo tratamento com veiculo (1 mL/Kg) ou AM251 (3 mg/Kg). Escala: 100 μ m. Ao lado estão os gráficos do número de células positivas para c-Fos para cada quadro de fotomicrografias. Valores expressos como média \pm EPM. * p <0,05; *** p <0,001 quando comparado com as ratas tratadas com salina + veiculo. # p <0,05; ## p <0,01 quando comparado com as ratas tratadas com DEXA + veiculo.

Com relação à expressão de c-Fos em neurônios ocitocinérgicos, pode-se observar que o tratamento com DEXA + veiculo diminuiu o número de células positivas para c-Fos nos

neurônios ocitocinérgicos do PVN (Figura 20A; $p < 0,001$) e do SON (Figura 20B; $p < 0,001$) quando comparado com as ratas que foram tratadas com salina + veículo. O tratamento com AM251 reverteu o efeito da dexametasona, ou seja, as ratas que foram tratadas com DEXA + AM251 tiveram o número de células positivas para c-Fos nos neurônios ocitocinérgicos do PVN (Figura 20A; $p < 0,001$) e do SON (Figura 20B; $p < 0,001$) aumentados quando comparados com o grupo DEXA + veículo, sem alterar o número de c-Fos em neurônios ocitocinérgicos no PVN e SON de ratas tratadas com salina.

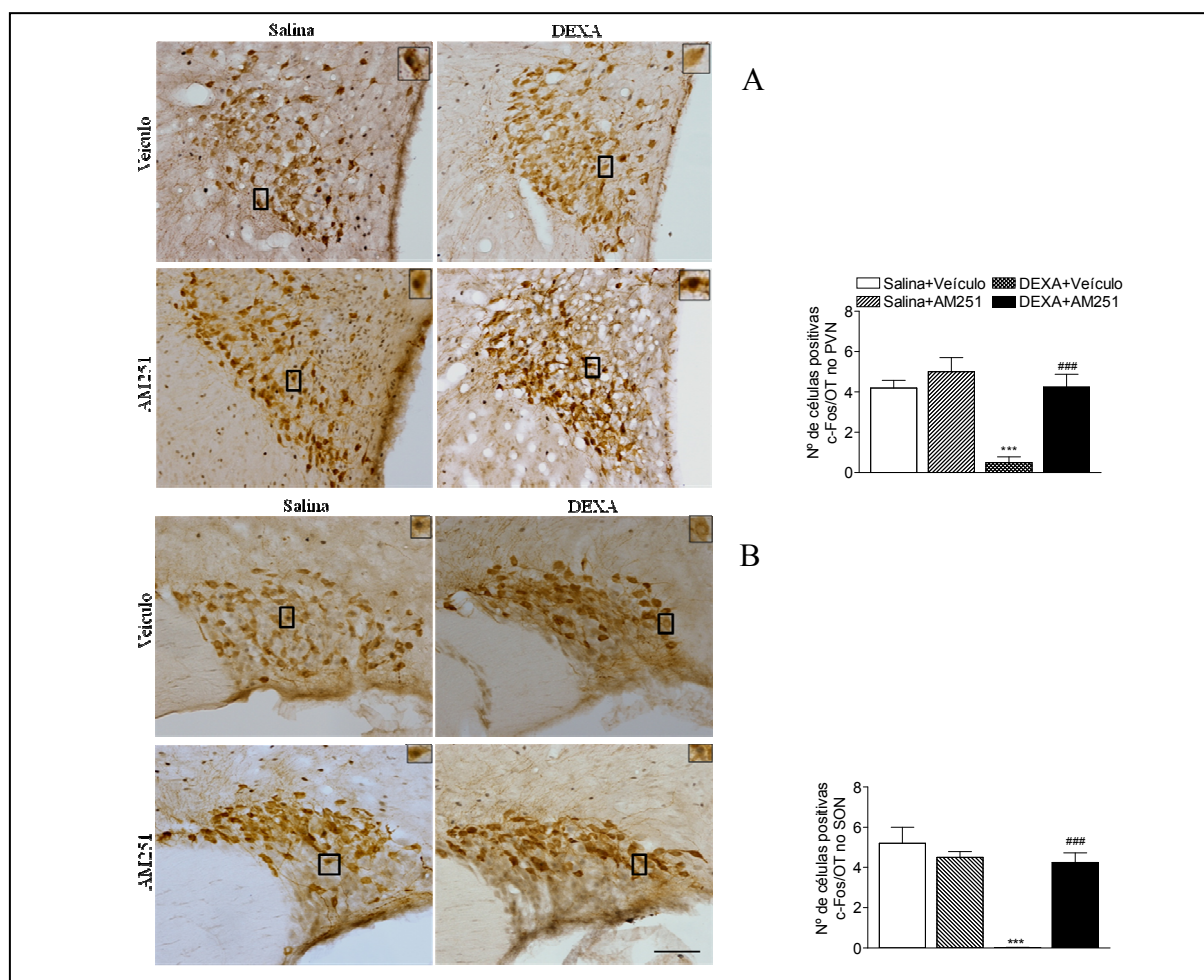


Figura 20: Fotomicrografias representativas (20x) de cortes de encéfalos mostrando células positivas para c-Fos nos neurônios ocitocinérgicos do PVN (A) e do SON (B) em ratas lactantes pré-tratadas com salina (1 mL/Kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) seguido pelo tratamento com veículo (1 mL/Kg) ou AM251 (3 mg/Kg). Em detalhe, o citoplasma de neurônios ocitocinérgicos ou dupla marcação c-Fos/OT. Escala: 50 μ m. Ao lado estão os gráficos do número de células positivas para c-Fos nos neurônios ocitocinérgicos para cada quadro de fotomicrografias. Valores expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ quando comparado com as ratas tratadas com salina + veículo. ### $p < 0,001$ quando comparado com as ratas tratadas com DEXA + veículo.

5.15 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE A AÇÃO DA DEXAMETASONA NO GANHO DE PESO DA NINHADA

Na figura 21 pode ser observado que as ratas que foram tratadas com DEXA + veículo tiveram o ganho de peso das suas ninhadas diminuído quando comparado com as ninhadas das ratas do grupo salina + veículo ($p < 0,01$). No entanto, a administração de AM251 aumentou o ganho de peso da ninhada das mães que foram pré-tratadas com dexametasona ($p < 0,05$) quando comparado com as ninhadas das ratas que foram tratadas com DEXA + veículo.

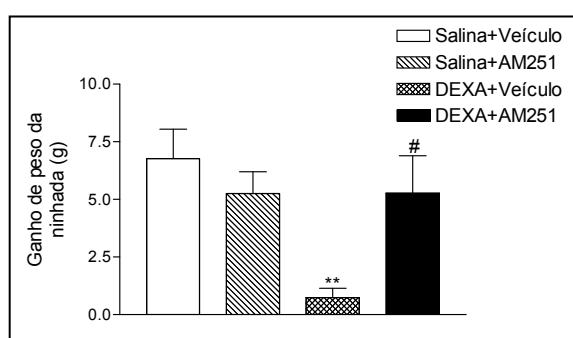


Figura 21: Efeito do tratamento com antagonista do receptor CB1 (AM251; 3 mg/kg) em ratas lactantes pré-tratadas com salina (1 mL/kg) ou dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg) sobre o ganho de peso da ninhada. Valores expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ quando comparado com as ratas tratadas com salina + veículo. # $p < 0,05$ quando comparado com as ratas tratadas com DEXA + veículo.

5.16 EFEITO DO WIN55,212-2 (AGONISTA DO RECEPTOR CB1) NO COMPORTAMENTO MATERNO

A análise do CM mostrou que o tratamento com WIN 1 ou 3 mg/Kg em ratas lactantes prejudicou a construção do ninho, pois as ratas demoraram mais tempo para agrupar os filhotes e não montaram o ninho completo (Figura 21A). A administração de 3 mg/Kg aumentou a latência para a rata pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho ($p < 0,01$; Figura 21B) e diminuiu o tempo de *licking pups* ($p < 0,01$; Figura 21C) quando comparado com as ratas tratadas com veículo. Não houve diferença significativa entre os grupos na porcentagem de permanência sobre os filhotes (Figura 21D). A administração de WIN (1 ou 3 mg/Kg) diminuiu a porcentagem de permanência na posição de cifose ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente; Figura 21E) e diminuiu a porcentagem de comportamento materno total ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente; Figura 21F) quando comparado com as ratas tratadas

com veículo. Com relação aos parâmetros não maternos, o tratamento com WIN 3 mg/Kg aumentou o tempo *self-grooming* ($p<0,05$; Figura 21H) quando comparado com as ratas tratadas com veículo.

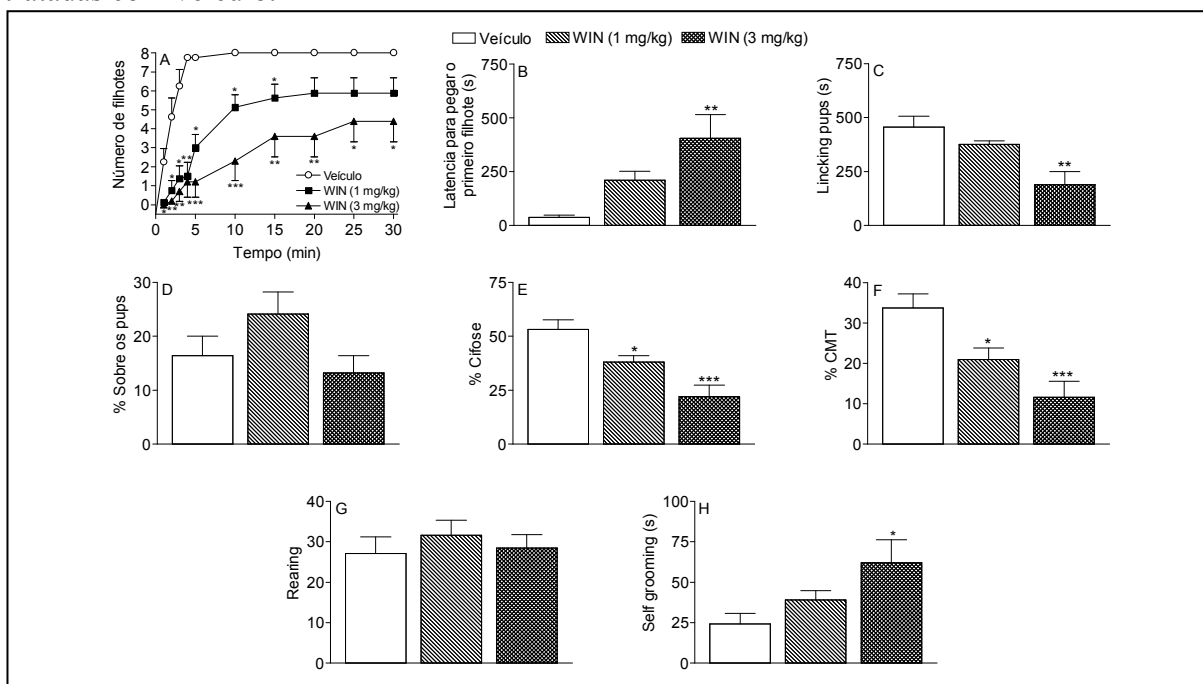


Figura 22: Efeito da administração de agonista do receptor CB1, WIN (nas doses de 1 e 3 mg/Kg) sobre a construção do ninho (A), latência em segundos para a rata pegar o primeiro filhote e levá-lo ao ninho (B), tempo em segundos de *licking pups* (C), porcentagem de permanência sobre os filhotes (D), porcentagem de permanência na posição de cifose (E), porcentagem de comportamento materno total (F), número de *rearing*s (G) e tempo em segundos de *self-grooming* (H). Valores expressos como média \pm EPM. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ quando comparado com as ratas tratadas com veículo (1 mL/Kg).

5.17 EFEITO DO WIN55,212-2 (AGONISTA DO RECEPTOR CB1) NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO

A administração de WIN (3 mg/Kg) aumentou a latência em segundos para o primeiro ataque ($p<0,05$; Figura 22A) quando comparado ao grupo veículo. O tratamento com WIN 1 ou 3 mg/Kg diminuiu o número de ataque frontal ($p<0,05$ e $p<0,01$ respectivamente; Figura 22B), diminuiu o número de ataque lateral ($p<0,05$ e $p<0,01$ respectivamente; Figura 22C), diminuiu o número de ameaça lateral ($p<0,01$ e $p<0,001$ respectivamente; Figura 22D) e diminuiu o comportamento materno em segundos ($p<0,001$; Figura 22F) quando comparado com as ratas que foram tratadas com veículo. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao tempo de *grooming* (Figura 22E).

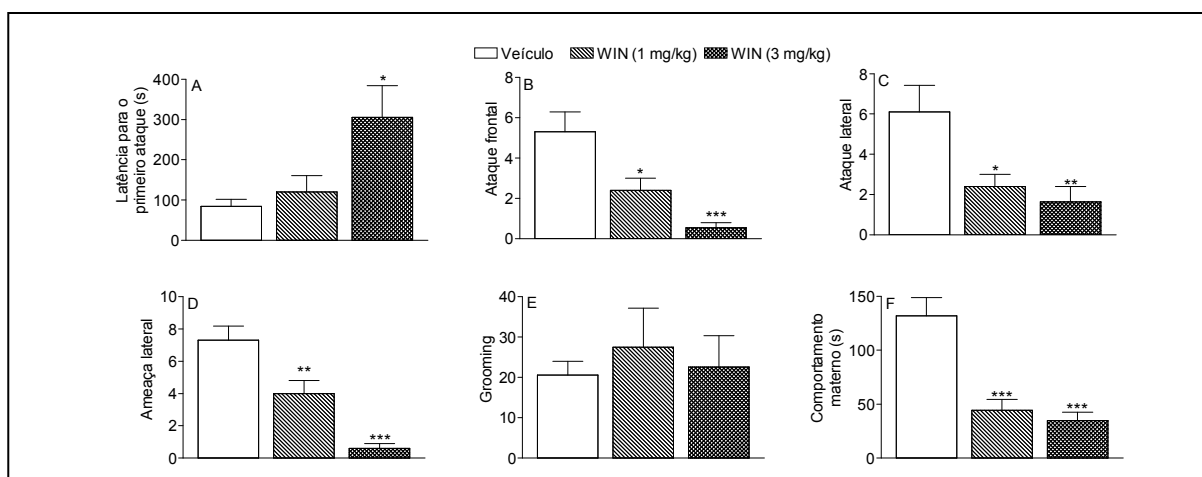


Figura 23: Efeito da administração de agonista do receptor CB1, WIN (nas doses de 1 e 3 mg/Kg) sobre a latência em segundos para o primeiro ataque (A), número de ataque frontal (B), número de ataque lateral (C), número de ameaça lateral (D), tempo em segundos de *self-grooming* (E) e comportamento materno em segundos (F). Valores expressos como média \pm EPM. $P < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com as ratas tratadas com veículo (1 mL/Kg).

5.18 EFEITO DO WIN55,212-2 NO LABIRINTO EM T ELEVADO E NO CAMPO ABERTO

Na figura 23 pode ser observado que o tratamento com WIN 3 mg/Kg aumentou a latência em segundos para linha base e esquiva 1 ($p < 0,05$; Figura 23A) quando comparado as ratas tratadas com veículo. As ratas que foram tratadas com WIN 1 ou 3 mg/Kg tiveram o tempo para fuga diminuído ($p < 0,05$; Figura B) quando comparado com as ratas do grupo veículo.

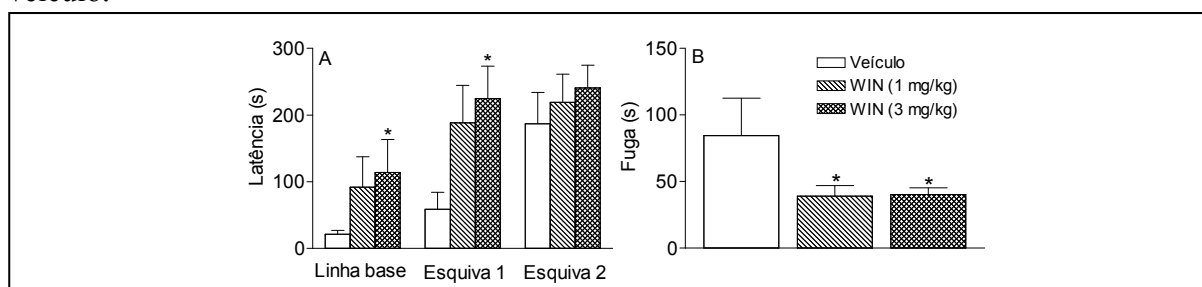


Figura 24: Efeito da administração de agonista do receptor CB1, WIN (nas doses de 1 e 3 mg/Kg) sobre a latência em segundos para linha base, esquiva 1 e esquiva 2 (A) e, latência em segundos para fuga (B) em ratas lactantes no labirinto em T elevado. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado as ratas lactantes tratadas com veículo (1 mL/Kg).

Com relação ao teste do campo aberto, pode-se observar que não houve diferença significativa entre os grupos no número de entradas na periferia e no total de entradas (Figura 24A e 24C respectivamente). Porém, foi observado uma diminuição no número de entradas no

centro nas ratas tratadas com WIN 1 ou WIN 3 mg/Kg ($p < 0,001$ $p < 0,01$ respectivamente; Figura 24B) e conseqüentemente na razão de entradas no centro sobre o total de entradas ($p < 0,01$ $p < 0,05$ respectivamente; Figura 24D) quando comparadas as ratas tratadas com veículo.

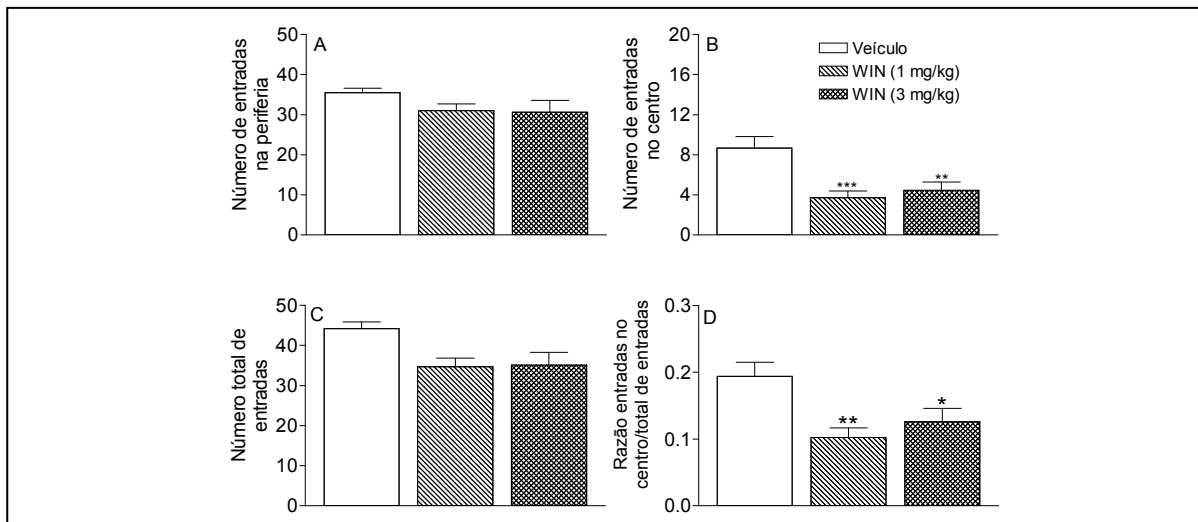


Figura 25: Efeito da administração de agonista do receptor CB1, WIN (nas doses de 1 e 3 mg/Kg) sobre o número de entradas na periferia (A), número de entradas no centro (B), número total de entradas (C) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (D) em ratas não lactantes e lactantes no campo aberto. Valores expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ quando comparado com as ratas não lactantes. ### $p < 0,001$ quando comparado com as ratas lactantes tratadas com salina (1 mL/Kg).

5.19 EFEITO DO WIN55,212-2 NA EXPRESSÃO DE c-FOS NA BST E MNPO E EM NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS NO PVN E SON

Na figura 25 pode-se observar que o tratamento com WIN (1 ou 3 mg/Kg) diminuiu o número de células positivas para c-Fos na BST (Figura 25A; $p < 0,001$) e no MnPOd (Figura 23B; $p < 0,01$) quando comparado com as ratas que foram tratadas com veículo. Não houve diferença significativa quanto ao número de células positivas para c-Fos no MnPOv entre os grupos experimentais.

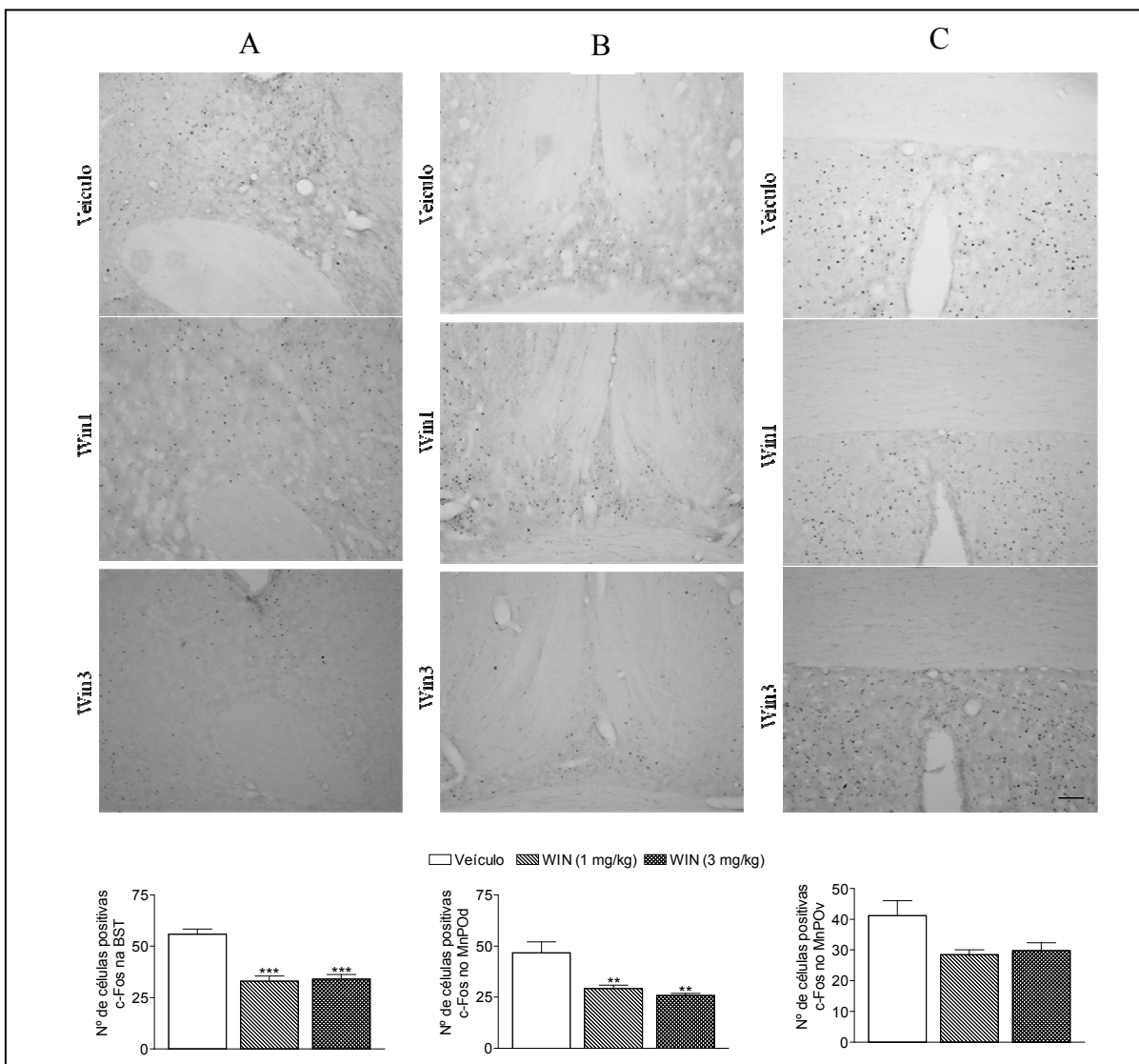


Figura 26: Fotomicrografias representativas (10x) de cortes de encéfalos mostrando células positivas para c-Fos na BST (A), MnPOd (B) e MnPOv (C) em ratas lactantes pré-tratadas com WIN (1 mg/Kg) e WIN (3 mg/Kg). Escala: 100 μ m. Abaixo estão os gráficos do número de células positivas para c-Fos para cada quadro de fotomicrografias. Valores expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com as ratas tratadas com veículo (1 mL/Kg).

Com relação à expressão de c-Fos em neurônios ocitocinérgicos, o tratamento com WIN (1 ou 3 mg/Kg) diminuiu o número de células positivas para c-Fos nos neurônios ocitocinérgicos do PVN (Figura 26A; $p < 0,001$) e do SON (Figura 26B; $p < 0,001$) quando comparado com as ratas que foram tratadas com veículo.

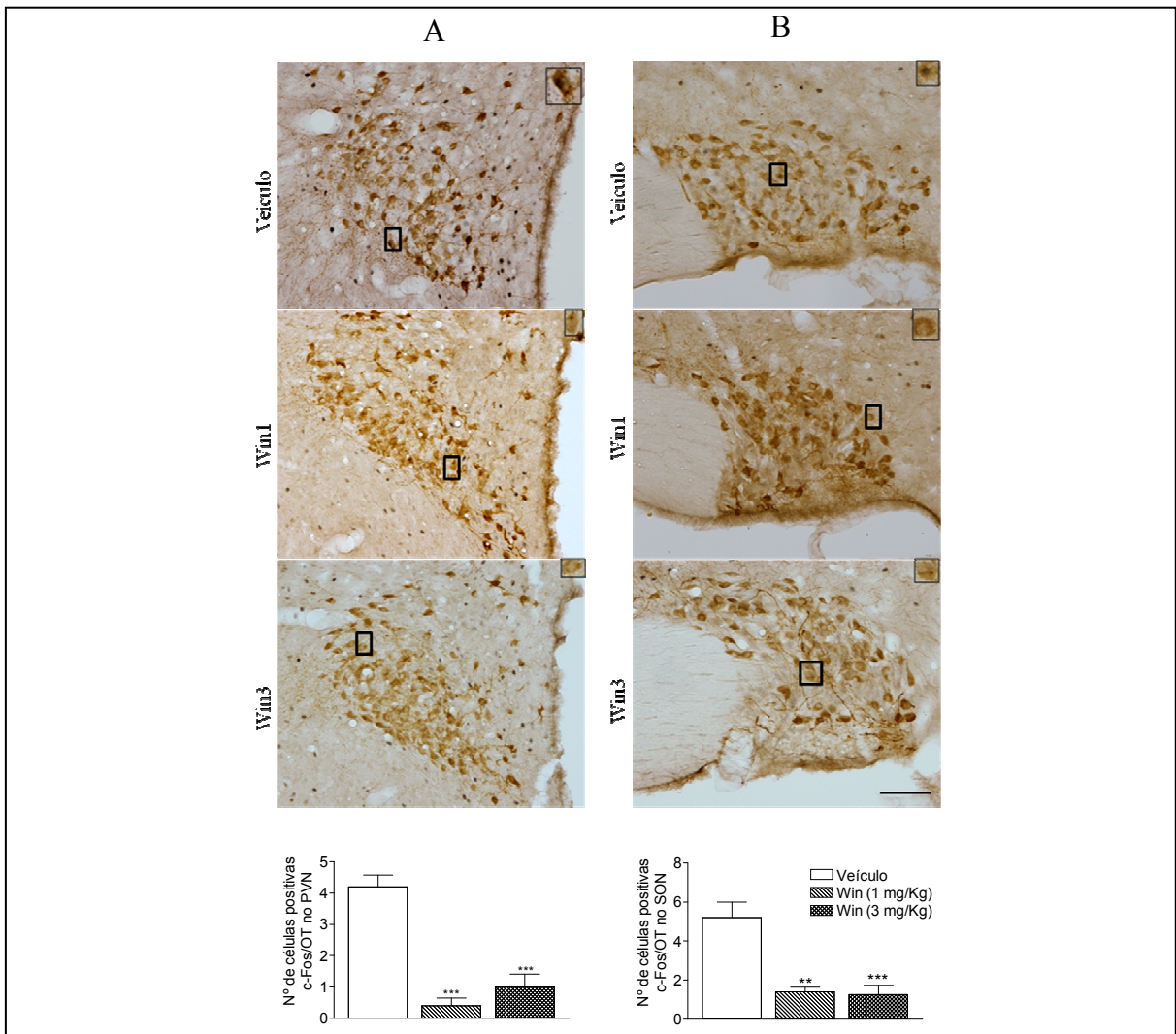


Figura 27: Fotomicrografias representativas (20x) de cortes de encéfalos mostrando células positivas para c-Fos nos neurônios ocitocinérgicos do PVN (A) e do SON (B) em ratas lactantes pré-tratadas WIN (1 mg/Kg) e WIN (3 mg/Kg). Em detalhe, o citoplasma de neurônios ocitocinérgicos ou dupla marcação c-Fos/OT. Escala: 50 μ m. Abaixo estão os gráficos do número de células positivas para c-Fos nos neurônios ocitocinérgicos para cada quadro de fotomicrografias. Valores expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com as ratas tratadas com veículo (1 mL/Kg).

5.20 EFEITO DO WIN55,212-2 SOBRE O GANHO DE PESO DA NINHADA

Na figura 27 pode ser observado que as ratas que foram tratadas com WIN (1 ou 3 mg/Kg) tiveram o ganho de peso das suas ninhadas diminuído quando comparado com as ratas do grupo controle ($p < 0,05$).

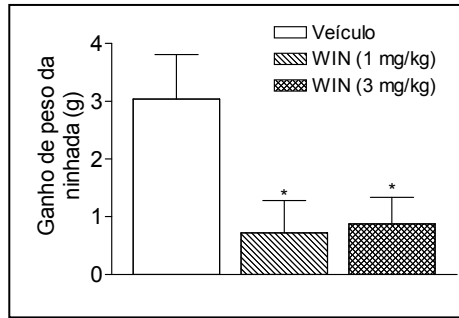


Figura 28: Efeito da administração de agonista do receptor CB1, WIN (nas doses de 1 e 3 mg/Kg) sobre o ganho de peso da ninhada em gramas. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com as ratas lactantes tratadas com veículo (1 mL/Kg).



6. DISCUSSÃO

6.1 EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE AS RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS E COMPORTAMENTAIS EM RATAS LACTANTES

A administração de dexametasona reduziu o comportamento materno, assim como o comportamento agressivo, reduziu a secreção de prolactina e ocitocina, diminuiu a ejeção de leite em ratas lactantes além de reverter a ansiólise maternal.

Durante a lactação ocorre uma variedade de alterações hormonais e comportamentais na mãe (CHAMPAGNE *et al.*, 2003; GROSVENOR *et al.*, 1986). O estímulo de sucção aumenta as concentrações plasmáticas de ocitocina (HIGUCHI *et al.*, 1985; HIGUCHI *et al.*, 1986; TAYA; GREENWALD, 1982), prolactina (TAYA; SASAMOTO, 1990; TAYA; GREENWALD, 1982; TAYA; SASAMOTO, 1989; GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001) e corticosterona (VOOGT *et al.*, 1969) enquanto diminui as concentrações de LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante) (TAYA; SASAMOTO, 1990; TAYA; GREENWALD, 1982; TAYA; SASAMOTO, 1989). Durante a sucção, a síntese e liberação de ambos os hormônios, prolactina e ocitocina, está sob controle de diversos, fatores hipotalâmicos e extra-hipotalâmicos, (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001; VOOGT *et al.*, 1969; FREEMAN *et al.*, 2000; BEN-JONATHAN; HNASKO, 2001), mas a influência dos glicocorticóides sobre a liberação destes hormônios, assim como sua relação com aspectos comportamentais durante a lactação era pouco estudada.

Sabendo-se que a ejeção de leite ocorre apenas durante os picos plasmáticos de ocitocina, a diminuição dos níveis de ocitocina durante a lactação em ratas tratadas com dexametasona pode resultar em menor transferência de leite para os filhotes, representando assim um menor ganho de peso da ninhada.

No período da lactação, ocorre um acentuado aumento na regulação da expressão de receptor para prolactina no plexo coróide e no hipotálamo. Na maioria dos núcleos hipotalâmicos há um aumento significativo no número de neurônios imunorreativos para o receptor de prolactina (PI; GRATTAN, 1999). Além disso, alguns núcleos do hipotálamo incluindo o PVN e o núcleo ventromedial, que não expressam receptor para prolactina em ratas não lactantes, passam a expressá-los durante a lactação.

Essas adaptações são fundamentais para o desenvolvimento e manutenção da lactação e sugerem um efeito da prolactina no SNC. Em contraste a muitos outros neuropeptídeos, a prolactina que é secretada para o sangue, chega ao SNC através do transporte ativo mediado por receptor via células do plexo coróide (WALSH *et al.*, 1987).

Além de seus efeitos periféricos conhecidos sobre as glândulas mamárias, a prolactina desempenha um importante papel na regulação do comportamento materno no SNC (BRIDGES *et al.*, 1985; BRIDGES *et al.*, 1990; MELO *et al.*, 2009). Um estudo mostrou que a prolactina administrada na área pré óptica medial promoveu um aumento no comportamento materno (BRIDGES *et al.*, 1990). A confirmação do papel da prolactina no comportamento materno pode ser demonstrada em outro estudo com camundongos *knockout* para receptores de prolactina. Nesse estudo, os camundongos demonstraram diminuição ou ausência de comportamento materno durante a lactação (LUCAS *et al.*, 1998). Em ratas, a infusão i.c.v. crônica de um antisense seletivo para receptor de prolactina também diminuiu o comportamento materno durante a lactação (TORNER *et al.*, 2002).

Esses estudos corroboram os nossos achados e juntamente sugerem que a diminuição na secreção de prolactina influencia na interrupção do CM induzida pela administração de dexametasona.

A sucção mamilar também influencia na secreção de ocitocina (MOOS *et al.*, 1989; LENG *et al.*, 2008). A síntese de ocitocina ocorre principalmente em neurônios dos PVN e SON do hipotálamo e é liberada dos terminais nervosos para a hipófise posterior e para diversas outras regiões cerebrais. Em ratas lactantes, a sucção estimula a liberação simultânea de ocitocina para a corrente sanguínea e para o SNC (MOOS *et al.*, 1989; NEUMANN *et al.*, 1993a; LENG *et al.*, 2008; KENDRICK 2000; NEUMANN *et al.*, 1993b). A liberação de ocitocina em resposta a sucção tem sido medida utilizando o método de microdiálise no hipotálamo médio basal, no *bed* núcleo da estria terminal e na área pré óptica medial de ovelhas durante a lactação (NEUMANN *et al.*, 1993a; KENDRICK 2000; NEUMANN *et al.*, 1993b).

A ocitocina liberada pelos neurônios no SNC está envolvida na regulação do comportamento reprodutivo e materno além de ser um componente crítico na resposta integrada ao estresse (LANDGRAF; NEUMANN, 2004; NEUMANN, 2007). As áreas do SNC onde a ocitocina atua, incluem muitas estruturas do hipotálamo e do sistema límbico que recebem projeções de neurônios ocitocinérgicos hipotalâmicos e são componentes de uma rede regulatória que controlam funções fisiológicas e comportamentais específicas (NEUMANN, 2007).

Comprovando o papel da ocitocina endógena em controlar o comportamento materno, alguns estudos demonstraram que a infusão de um antagonista de ocitocina no SNC bloqueou o início do comportamento materno em ratas que tinham acabado de ter seus filhotes

(FAHRBACH *et al.*, 1985; VAN LEENGOED *et al.*, 1987). Em adição, nosso estudo sugere que a diminuição na secreção de ocitocina influencia na interrupção do CM induzida pela administração de dexametasona.

Manipulações farmacológicas feitas no sistema ocitocinérgico no núcleo central da amígdala, no *bed* núcleo da estria terminal e na porção parvocelular do PVN mostraram mudanças na agressão maternal (GIOVENARDI *et al.*, 1998; JOHNS *et al.*, 1998; ELLIOTT *et al.*, 2001; LUBIN *et al.*, 2003). Estas áreas estão envolvidas no comportamento agressivo (INSEL, 1992; CHOZICK, 1986; KEMBLE *et al.*, 1990; GAMMIE; NELSON, 2001) e no comportamento materno (CONSIGLIO *et al.*, 2005; FRANCIS *et al.*, 2000; KENDRICK *et al.*, 1992) e elas exibem uma alta densidade de receptores para ocitocina (TRIBOLLET *et al.*, 1992).

A agressão maternal é um tipo de comportamento que faz parte do repertório comportamental que as fêmeas adotam assim que seus filhotes nascem. A influência de hormônios, incluindo os glicocorticóides, nesse tipo de comportamento ainda não é completamente elucidada. Similar aos outros comportamentos maternos, a dexametasona reduziu a agressão maternal nas ratas e esse efeito pode ser mediado pela ocitocina e prolactina.

Regiões do SNC como o sistema olfatório, núcleos da base, o sistema límbico, o tálamo, o hipotálamo e o tronco cerebral expressam altos níveis de receptores para ocitocina (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001; TRIBOLLET *et al.*, 1988; YOSHIMURA *et al.*, 1993; VEINANTE; FREUND-MERCIER, 1997; YOSHIDA *et al.*, 2009), sugerindo uma convergência de vias comportamentais e neuroendócrinas. Curiosamente, os glicocorticóides circulantes exercem efeitos regulatórios nos receptores centrais para ocitocina, modulando sua expressão em muitas estruturas encefálicas (LIBERZON *et al.*, 1994; LIBERZON; YOUNG, 1997; PATCHEV *et al.*, 1993).

Os glicocorticóides diminuem a secreção não só de ocitocina, mas também de prolactina. Este efeito pode ser observado em ratos machos em resposta a expansão de volume isotônico e hipertônico, em que a dexametasona suprimiu a secreção de prolactina e ocitocina (LAUAND *et al.*, 2007; TORNER *et al.*, 2002). Além disso, a dexametasona reduziu a secreção de ocitocina e a expressão de c-Fos em neurônios magnocelulares do PVN e SON em ratos machos submetidos à expansão de volume sanguíneo e estimulação colinérgica central (RUGINNSK *et al.*, 2007; LAUAND *et al.*, 2007).

Outros estudos sugerem que a ação dos glicocorticóides nos neurônios magnocelulares seja predominantemente inibitória. Alguns pesquisadores acreditam que os glicocorticóides podem agir em receptores transmembrana acoplados a proteína G para estimular a liberação de endocanabinóides no hipotálamo (DI *et al.*, 2003; DI *et al.*, 2005). Subsequentemente, os endocanabinóides poderiam agir como mensageiros retrógrados que não somente inibiriam a liberação de glutamato, mas também estimulariam a liberação de GABA (ácido γ -aminobutírico) contribuindo assim para a diminuição da atividade de neurônios hipotalâmicos parvocelulares e magnocelulares (RUGINNSK *et al.*, 2009; RUGINNSK *et al.*, 2010). Esta hipótese também sugere um mecanismo pelo qual os glicocorticóides podem suprimir a resposta hormonal à sucção que é essencial para promover a lactação e o comportamento materno.

Em condições de estresse, os glicocorticóides modulam funções essenciais como metabolismo, imunidade e atividade cardiovascular, enquanto simultaneamente suprimem funções não essenciais como sexual, reprodutiva e comportamento materno (WINGFIELD; SAPOLSKY, 2003). Consequentemente, alguns autores têm sugerido que a resposta do eixo HHA ao estresse pode ser diminuída durante períodos de alto investimento (dedicação) na reprodução, protegendo este esforço reprodutivo de possível interrupção induzida pela resposta ao estresse (WINGFIELD; SAPOLSKY, 2003; BÓKONY *et al.*, 2009).

Consistente com esta hipótese, durante a lactação, a variação circadiana na atividade do eixo HHA é interrompida e as respostas a agentes estressores são atenuadas. Com isso, vários estímulos estressores são quase que incapazes de estimular o eixo HHA durante a lactação (BRUNTON *et al.*, 2008; SHANKS *et al.*, 1999) e as variações nos níveis de glicocorticóides são atenuadas. Limitar as flutuações (principalmente aumentos) na secreção de glicocorticóides são importantes para evitar seus efeitos catabólicos, que durante a lactação, tal limitação contribuiria com a manutenção do aporte energia proveniente do leite para a prole (BRUNTON *et al.*, 2008).

As adaptações do eixo HHA durante a lactação são necessárias para limitar a liberação de glicocorticóides para os filhotes, protegendo-os contra os efeitos adversos da excessiva ativação do eixo HHA (BRUNTON *et al.*, 2008). Entretanto, o efeito da administração aguda de glicocorticóides sobre as respostas neuroendócrinas e comportamentais é pouco estudado. Em nosso estudo, concluímos que o tratamento com dexametasona reduziu as respostas neuroendócrinas e atenuou o comportamento materno e agressivo em ratas lactantes. Estes resultados sugerem que o significado funcional dessas respostas do eixo HHA durante a

lactação está envolvido em respostas neuroendócrinas e comportamentais adequadas à sucção.

Outra alteração comportamental expressa durante a lactação é a chamada ansiólise maternal. Nossos experimentos revelaram que o tratamento com dexametasona alterou a aquisição da esQUIVA inibitória em ratas lactantes e diminuiu a latência para fuga no labirinto em T elevado. Em adição, a dexametasona reduziu o número de entradas no centro do campo aberto e diminuiu o efeito anti-tigmotático em ratas lactantes.

Embora o labirinto em T elevado e o campo aberto serem modelos preditivos para ansiedade, ambos induzem a diferentes tipos de comportamentos em animais, e estes comportamentos são análogos a diferentes psicopatologias. Assim, o labirinto em T elevado é um aparato que permite avaliar respostas relacionadas ao medo condicionado (esQUIVA inibitória) e ao medo inato (tempo de fuga) (GRAEFF *et al.*, 1998). O teste de campo aberto pode ser usado para avaliar o efeito anti-tigmotático e a atividade locomotora dos animais (PRUT, BELZUNG 2003; VILELA *et al.*, 2009). As ratas lactantes tratadas com veículo mostraram redução da responsividade emocional, que foi avaliada pelo labirinto em T elevado e campo aberto, mostrando um comportamento típico de ansiólise maternal (FERREIRA *et al.*, 1989; FLEMING; LUEBKE, 1981; LONSTEIN, 2007).

A ansiólise maternal das ratas lactantes é modulada pelos filhotes. Assim, a presença dos filhotes pode induzir ou potencializar a ansiólise no campo aberto (FLEMING; LUEBKE, 1981) e em testes de conflito (FERREIRA *et al.*, 1989). A maneira pela qual os filhotes reduzem respostas relacionadas à ansiedade nas ratas lactantes nesses modelos é desconhecida, mas eles certamente aumentam a motivação maternal para gastar mais energia e superar adversidade para garantir a própria sobrevivência. Todavia, essas mudanças comportamentais após o parto parecem depender de alterações hormonais, tais como aumento nos níveis de ocitocina e prolactina (NEUMANN *et al.*, 2000; LONSTEIN *et al.*, 1998; BOSCH; NEUMANN, 2008).

Ambos os hormônios têm demonstrado ter propriedades ansiolíticas não somente na lactação. Em ratas nulíparas e em ratos machos, a administração central de ocitocina resulta em níveis reduzidos de ansiedade no labirinto em cruz elevado e na caixa claro escuro. A injeção crônica i.c.v. de ocitocina via mini-bombas osmóticas resultou em diminuição da ansiedade de ratas lactantes (BOSCH; NEUMANN, 2008). Em adição, a elevação crônica de ocitocina no SNC em ratas nulíparas está relacionada à atenuação da resposta emocional ao estresse de ruído agudo (WINDLE *et al.*, 1997). Outros estudos demonstraram que a infusão i.c.v. de um antagonista do receptor para ocitocina aumentou a ansiedade enquanto que

simultaneamente reduz os cuidados maternos (BOSCH; NEUMANN, 2008) e a agressão maternal (BOSCH *et al.*, 2005).

Estudos prévios relataram que camundongos com baixos níveis de prolactina durante a fase inicial da prenhes (ou gestação) exibiram aumento na ansiedade durante a lactação e as interações com os filhotes foram prejudicadas (TORNER *et al.*, 2002; SLATTERY; NEUMANN, 2008). Adicionalmente, tem sido demonstrado que a interação dos filhotes com a mãe aumenta a expressão de RNAm assim como a liberação de prolactina, especificamente entre o PVN do hipotálamo e áreas pré ópticas nas ratas lactantes (PI; GRATTAN, 1999). Essas regiões modulam a ansiedade e são as duas prováveis áreas cerebrais onde o contato dos filhotes com a mãe aumenta a prolactina intracerebral e reduz a ansiedade nas mães (SLATTERY; NEUMANN, 2008).

Nossos experimentos mostraram que a diminuição da resposta emocional para o labirinto em T elevado e para o teste do campo aberto é comprometida pela administração de dexametasona em ratas lactantes. De acordo com nossos resultados, nós sugerimos que a dexametasona reverteu a ansiólise maternal ou exerceu um efeito ansiogênico (no labirinto em T elevado e campo aberto) e panicogênico (no labirinto em T elevado), exclusivamente nas ratas lactantes. Glicocorticóides afetam a resposta neuroendócrina à sucção em ratas lactantes e são capazes de reduzir a ocitocina e prolactina (VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2011). Esses efeitos podem ser responsáveis pela reversão da ansiólise maternal em ratas lactantes.

Em ambos os aparatos, labirinto em T elevado e campo aberto, as ratas lactantes que foram tratadas com dexametasona mostraram um perfil semelhante ao das ratas não lactantes. Além disso, a dexametasona não alterou o padrão comportamental de ratas não lactantes. Durante o período após o parto, ocorre um aumento na incidência de desordens relacionadas ao humor (SEYFRIED, MARCUS, 2003; MUNK-OLSEN *et al.*, 2006; LONSTEIN, 2007). A ansiedade é a desordem de humor mais comum após o parto, e pode afetar a relação dos filhotes com as mães (MATTHEY *et al.*, 2003; WEINGBERG *et al.*, 2008). Tentativas para entender os mecanismos subjacentes da desordem de humor após o parto têm sido dificultadas pela falta de um modelo animal apropriado que induz a ansiedade, mas mantêm as variações hormonais que ocorrem durante a lactação. No nosso estudo, foi demonstrado que a administração de dexametasona em ratas lactantes reverteu a ansiólise maternal, sugerindo assim que os glicocorticóides podem provocar um estado semelhante com a ansiedade no período pós-parto.

6.2 INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DO EIXO HHA SOBRE AS RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS E COMPORTAMENTAIS EM RATAS LACTANTES

Em nosso estudo, a administração de LPS em ratas lactantes diminuiu o comportamento materno e agressivo, reverteu parcialmente a ansiólise maternal e reduziu a secreção de prolactina e ocitocina. O pré-tratamento com a metirapona reverteu parcialmente os efeitos que foram produzidos pela administração de LPS sugerindo uma possível mediação feita pelos glicocorticóides endógenos, liberados em decorrência da ativação do eixo HHA.

A administração periférica de LPS induz a diversas respostas envolvendo o sistema nervoso central, tais como febre (KLUGER, 1991), comportamento doentio (KENT *et al.*, 1992), hiperalgesia (MAIER *et al.*, 1993) e ativação do eixo HHA (BERKENBOSCH *et al.*, 1992; RIVIER *et al.*, 1989). Citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , interleucina (IL)-1 β , IL-6 são produzidas por células do sistema imune e são considerados mediadores dos sintomas não específicos em resposta a administração do LPS (ROTHWELL, 1991; TILDERS *et al.*, 1994; TURNBULL *et al.*, 1995). Esta ativação do sistema imune pode ser considerada como uma perturbação da homeostase do organismo, gerando assim uma situação de estresse. De fato, o LPS é um potente agente estressor, e conseqüentemente, um estímulo para a ativação do eixo HHA (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; JONES; GILLHAM, 1988).

Os glicocorticóides são liberados em resposta à administração de LPS. No entanto a secreção dos glicocorticóides em resposta a ativação do sistema imune e outros agentes estressores é atenuada durante o período de lactação (CUI *et al.*, 2011).

Conforme mencionado anteriormente, nos mamíferos ocorrem mudanças fisiológicas e comportamentais durante a gestação a fim de preparar a mãe para o parto. Estas mudanças incluem o aparecimento do comportamento materno (ROSENBLATT *et al.* 1994; NEUMANN *et al.* 2001) para garantir o desenvolvimento e a sobrevivência da prole. Durante a gestação e lactação a resposta ao estresse está alterada, e tem sido demonstrado que a atividade do eixo HHA encontra-se severamente atenuada (STERN *et al.* 1973; NEUMANN *et al.* 1998b; RUSSELL *et al.* 1999). Tais mudanças parecem ser essenciais para o desenvolvimento adequado da prole, por exemplo, prevenindo o excesso de níveis circulantes de hormônio do estresse.

Estudos prévios demonstraram que durante o período de lactação ocorre uma reorganização hipotalâmica e algumas alterações nas funções basais do eixo HHA. Tem sido

observado que a expressão de RNAm de CRH está reduzida no PVN quando comparado com ratas não lactantes (WINTRIP *et al.*, 1997).

As adaptações maternas e a diminuição das respostas ao estresse durante a gestação e lactação são fatores importantes para o desenvolvimento dos filhotes, pois previnem aumentos excessivos nos níveis de glicocorticóides circulantes (ALTEMUS *et al.* 1995; MCCORMICK *et al.* 1995; VALLEE *et al.* 1997; WEINSTOCK, 2001). Por exemplo, tem sido demonstrado que ratas lactantes cujas mães foram expostas a estímulos estressores durante a lactação não desenvolveram as adaptações normais que são observadas durante a gestação (BOSCH *et al.*, 2007). Além disso, essas mães possuem elevada expressão de RNAm para CRH e vasopressina no PVN sugerindo uma desregulação dos circuitos do estresse, que por sua vez leva à reatividade elevada do eixo HHA nestas ratas (BOSCH *et al.*, 2007).

Embora os mecanismos básicos de como as ratas lactantes apresentam função do eixo HHA alterada e resposta ao estresse diminuída ainda não sejam bem estabelecidos (WINDLE *et al.*, 1997; LIGHTMAN *et al.*, 1998), algumas evidências sugerem que há uma diminuição dos sinais excitatórios no SNC sobre as respostas ao estresse envolvendo o tronco cerebral e o sistema límbico e ainda, níveis de catecolaminas hipotalâmicas alteradas (ABBUD *et al.*, 1994; HOFFMAN *et al.*, 1994; DA COSTA *et al.*, 1996; WINTRIP *et al.*, 1997).

De acordo com nossos resultados, a administração de LPS interrompeu o comportamento materno e diminuiu a secreção de prolactina e ocitocina, além de elevar a concentração plasmática de corticosterona. Com isso pode-se compreender a importância da hiporresponsividade das ratas lactantes frente a uma situação de estresse, uma vez que os níveis elevados de glicocorticóides circulantes podem reduzir o comportamento materno e a secreção de hormônios que são essenciais para as adaptações adequadas no período da lactação (VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2011), e amplamente discutido na seção anterior.

Para provarmos que os glicocorticóides endógenos modulam as respostas produzidas pelo LPS, foi utilizado a metirapona. A metirapona é um inibidor do citocromo P450 (WILLIAMSON, O'DONNELL, 1969) bloqueando a 11 β -hidroxilação de deoxicorticosterona (DOC) em corticosterona no córtex da adrenal (JENKINS *et al.*, 1958) e tem sido utilizada em roedores para estudar o papel dos glicocorticóides nos processos de estresse (MOUSA *et al.*, 1981; HALEEM *et al.*, 1988; CALVO *et al.*, 1998; MIKICS *et al.*, 2005).

Estudos prévios evidenciaram que a metirapona restaurou o estado febril em resposta a administração de LPS em ratas grávidas. Isto por que os glicocorticóides endógenos

desempenham um papel importante na modulação da resposta a febre pelo menos em parte, devido a sua influência sobre o balanço de citocinas (BRENT *et al.*, 2011).

Existem evidências de que a hiporresponsividade do eixo HHA durante a gravidez é mediada através de um mecanismo opióide, envolvendo um neuroesteróide chamado de alopregnanolona, que age na liberação de CRH pelos neurônios do PVN (BRUNTON *et al.*, 2005; BRUNTON; RUSSELL, 2008).

Em nosso estudo, o pré-tratamento com a metirapona foi capaz de reverter os efeitos produzidos pelo LPS no comportamento materno assim como em alguns parâmetros que foram avaliados para ansiólise maternal. No entanto, a metirapona reduziu o comportamento agressivo, de forma similar ao efeito do LPS.

Alguns estudos demonstram que a administração de metirapona pode levar a efeitos contraditórios (DROUET *et al.*, 2010), sendo que ela pode limitar comportamentos induzidos pelo estresse. A metirapona reduz o tempo de imobilidade quando administrada uma (HEALY *et al.*, 1999) ou três horas (BAEZ; VOLOSIN, 1994) antes do teste do nado forçado. Sua administração três horas antes a exposição do choque inescapável também diminui a resposta durante o teste (BAEZ *et al.*, 1996). Essas mudanças comportamentais que ocorrem durante a exposição ao estresse parecem refletir em uma diminuição na ansiedade. Outros estudos revelam que a administração de metirapona três horas antes a exposição ao estresse de contenção aumenta o tempo de permanência nos braços abertos durante o teste do labirinto em T elevado (CALVO *et al.*, 1998; CALVO; VOLOSIN, 2001). Além disso, tem sido demonstrado que após a administração de metirapona ocorre um aumento de 11-desoxicortisol e deoxicorticosterona (KRUGERS *et al.*, 2000) que são precursores para síntese de corticosterona.

De acordo com nossos resultados, o pré-tratamento com a metirapona reduziu a latência da esQUIVA inibitória no labirinto em T elevado que foi aumentada pela administração de LPS em ratas lactantes. Além disso, a metirapona aumentou o número de entradas no centro do campo aberto que havia sido prejudicada em ratas lactantes tratadas somente com LPS. Assim podemos concluir que a metirapona reverteu parte dos efeitos produzidos pela administração de LPS como demonstrado em estudos anteriores com outros agentes estressores.

Por outro lado, alguns autores afirmam que a metirapona pode agir como um agente estressor (ROTLLANT *et al.*, 2002). Estudos evidenciam que a administração de metirapona aumenta a expressão de c-Fos no PVN e também ativa o eixo HHA (HERMAN *et al.*, 1992).

Além disso, a metirapona foi capaz de aumentar as concentrações de vasopressina e CRH no sangue porta hipofisário (CONTE-DEVOLX *et al.*, 1992) e, as concentrações de ACTH (CONTE-DEVOLX *et al.*, 1992; HERMAN *et al.*, 1992; ROTLLANT; ARMARIO, 2005).

Com isso podemos compreender parte dos efeitos produzidos pela metirapona no comportamento de ratas lactantes, que diferentemente do comportamento materno, no qual a metirapona não exerceu qualquer efeito, a metirapona exerceu efeito semelhante ao do LPS, ou seja, diminuiu o comportamento agressivo.

6.3 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE SOBRE AS RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS E COMPORTAMENTAIS EM RATAS LACTANTES

Após separação maternal de 12 horas, a dexametasona reduziu o comportamento materno, bem como o comportamento agressivo e a ansiólise maternal. Além disso, o tratamento com a dexametasona reduziu o número de células positivas para c-Fos na BST, no MnPOd e MnPOv e, diminuiu o número de células positivas para c-Fos nos neurônios ocitocinérgicos do PVN e SON. Esses efeitos eram esperados, pois a dexametasona reduziu a secreção de hormônios essenciais para o desenvolvimento e manutenção da lactação. No entanto, o mecanismo pelo qual os glicocorticóides atuam sobre respostas neuroendócrinas e comportamentais em ratas lactantes era até então desconhecido.

Os glicocorticóides secretados pelo córtex da adrenal exercem efeitos inibitórios em muitos sistemas neuroendócrinos hipotalâmicos, incluindo, mas não limitando a regulação do *feedback* negativo do eixo HHA por supressão da secreção de CRH dos neurônios do PVN (HERMAN *et al.*, 1996).

A regulação do *feedback* negativo do eixo HHA pelos glicocorticóides ocorre por uma inibição relativamente rápida da liberação de CRH e cronicamente por uma regulação para baixo (*down regulation*) dos receptores de CRH e vasopressina nos neurônios do PVN (KELLER-WOOD; DALLMAN, 1984).

As ações clássicas dos glicocorticóides, assim como de outros esteróides, são mediadas pela ligação em receptores intracelulares e regulação de transcrição gênica (FALKENSTEIN *et al.*, 2000). Alguns estudos em diferentes espécies evidenciaram que as ações rápidas dos glicocorticóides são mediadas por receptores de membrana e ativação de mecanismos sinalizadores não genômicos. Assim, os glicocorticóides podem ligar-se em receptores de membrana específicos (SUYEMITSU; TERAYAMA, 1975; HARRISON *et al.*,

1979; ORCHINIK *et al.*, 1991) e causar uma rápida alteração no movimento de eletrólitos através da membrana celular (AVANZINO *et al.*, 1987; HUA; CHEN, 1989; FFRENCH-MULLEN, 1995).

Alguns estudos eletrofisiológicos mostraram que o *feedback* rápido pode ocorrer através da inibição na liberação de glutamato para neurônios de CRH no PVN via ligação de glicocorticóides em receptores de membrana mediando a síntese de endocanabinóides e ativação retrógrada de receptores de canabinóides pré sinápticos (DI *et al.*, 2003; MALCHER-LOPES *et al.*, 2006).

Os receptores para canabinóides são ativados *in vivo* por ligantes conhecidos como endocanabinóides (HILLARD, 2000; DI, 2009). Em geral, os endocanabinóides agem como sinalizadores sinápticos retrógrados que reduzem a liberação de neurotransmissores dos terminais nervosos e desempenha importante papel em certos tipos de plasticidade sináptica (MACKIE, 2008; FREUND *et al.*, 2003).

A ação de endocanabinóides através de receptores CB1 parece ser importante para a regulação do eixo HHA (HILL; MCEWEN, 2010). Antagonista do receptor CB1 leva a um aumento da atividade do eixo HHA em resposta ao estresse de contenção (PATEL *et al.*, 2004; GINSBERG *et al.*, 2010) enquanto que a facilitação da sinalização de endocanabinóides bloqueia a secreção de corticosterona em camundongos com estresse induzido por contenção (PATEL *et al.*, 2004).

Em adição a esses estudos, a resposta do eixo HHA frente a um ambiente novo é aumentada em camundongos *knockout* para receptores CB (BARNA *et al.*, 2004). Estes dados sugerem que o estresse aumenta a sinalização de endocanabinóides, que por sua vez restringem a ativação do HHA. Além disso, um estudo *in vivo* com cortes do hipotálamo, revelou que a rápida inibição mediada por glicocorticóides de neurônios parvocelulares é devida a ativação de receptores CB1 (DI *et al.*, 2003) sugerindo que este receptor pode participar do *feedback* negativo. Interessantemente, o estresse de contenção crônico eleva os níveis de 2-AG na amígdala e no presencéfalo de camundongos (PATEL *et al.*, 2005).

Estes dados são consistentes com a hipótese de que a inibição do *feedback* rápido do eixo HHA é mediada no mínimo em parte pelas as ações dos glicocorticóides nos receptores de membrana no PVN e que o receptor CB1 é necessário para que ocorra tal efeito (DI *et al.*, 2003; TASKER, 2011).

Em outro estudo, a administração de dexametasona diretamente no PVN ocasionou uma rápida inibição do eixo HHA em resposta ao estresse de contenção. Este efeito foi

completamente revertido pela administração concomitante do AM251, sugerindo que o receptor CB1 é necessário para esta via ser ativada (TASKER, 2011). Estes dados corroboram com o modelo de *feedback* sugerido por DI *et al.* (2003). Neste modelo proposto, as ações não genômicas dos glicocorticóides nos neurônios que sintetizam CRH no PVN ocasionam uma ativação da sinalização de endocanabinóides, iniciando assim a inibição retrógrada da liberação de glutamato para os neurônios parvocelulares no PVN que sintetizam CRH (Figura 28).

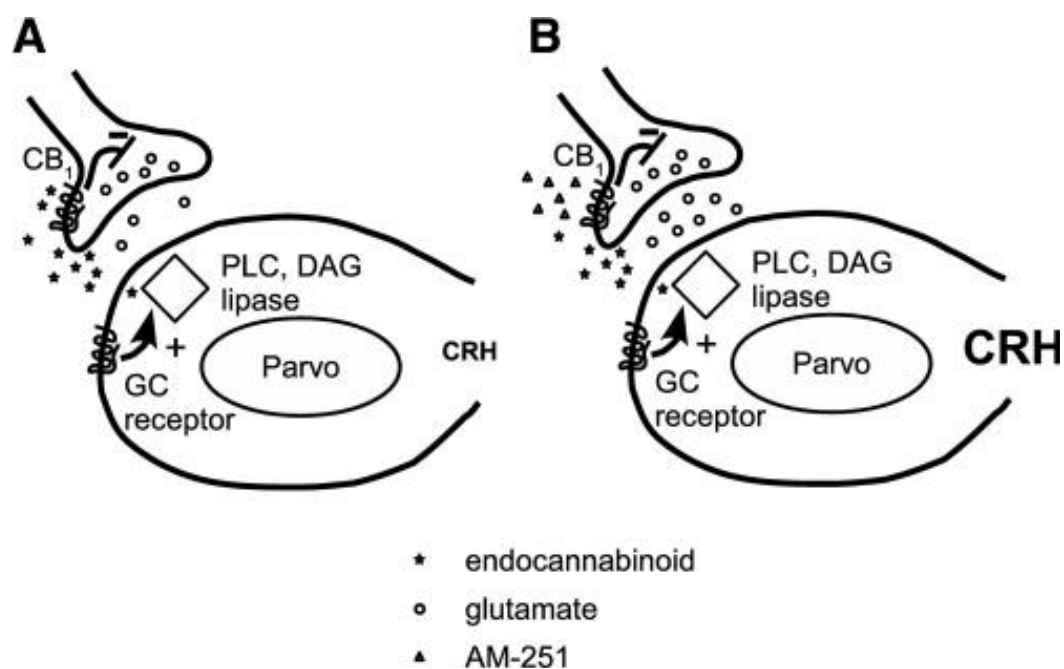


Figura 29: Modelo para ações mediadas por canabinóides do PVN no eixo HHA. Os glicocorticóides nas proximidades dos neurônios parvocelulares ligam-se a receptores para glicocorticóides localizados na membrana. A ligação dos glicocorticóides com seus receptores promove a síntese de endocanabinóides, o qual é liberado para a fenda sináptica. Após difusão, os endocanabinóides ligam-se a seus receptores ocasionando a diminuição na liberação de glutamato para os neurônios parvocelulares de CRH. Isto leva a uma diminuição na liberação de CRH para as células (A). Bloqueio de receptores CB1 ocasiona uma normalização na liberação de glutamato e assim, normalização na liberação de CRH para as células (B). Parvo: neurônio parvocelular; PLC: fosfolipase C; DAG: diacilglicerol. Fonte: EVANSON *et al.*, 2011.

Uma vez proposto este modelo para as ações dos glicocorticóides, nós utilizamos o AM251 para verificar a participação do sistema endocanabinóide sobre as respostas neuroendócrinas e comportamentais em ratas lactantes que foram diminuídas pela administração de dexametasona. O tratamento com AM251 reverteu a maioria dos efeitos que foram produzidos pela dexametasona, ou seja, aumentou o comportamento materno, bem como o comportamento agressivo e a ansiólise maternal. Além disso, o tratamento concomitante com AM251 e dexametasona aumentou o número de células positivas para c-

Fos na BST, no MnPOd e MnPOv e, aumentou o número de células positivas para c-Fos nos neurônios ocitocinérgicos do PVN e SON.

Diante dos nossos resultados, nós sugerimos um modelo para ação dos glicocorticóides mediada por endocanabinóides em neurônios magnocelulares e parvocelulares. Em nosso modelo sugerimos que os glicocorticóides liberados nas proximidades dos neurônios parvocelulares e magnocelulares do PVN ligam-se a receptores para glicocorticóides localizados na membrana. A ligação dos glicocorticóides com seus receptores promove a síntese e liberação de endocanabinóides, o qual é liberado para a fenda sináptica. Após difusão, os endocanabinóides ligam-se a seus receptores CB1 ocasionando a diminuição na liberação de neurotransmissores excitatórios para os neurônios parvocelulares e magnocelulares de ocitocina. Isto leva a uma diminuição na liberação de ocitocina, tanto dendrítica como plasmática. Com o bloqueio de receptores CB1 através da administração de AM251, ocorre uma normalização na liberação de neurotransmissores excitatórios e assim, normalização na liberação de ocitocina dendrítica e plasmática (FIGURA 29).

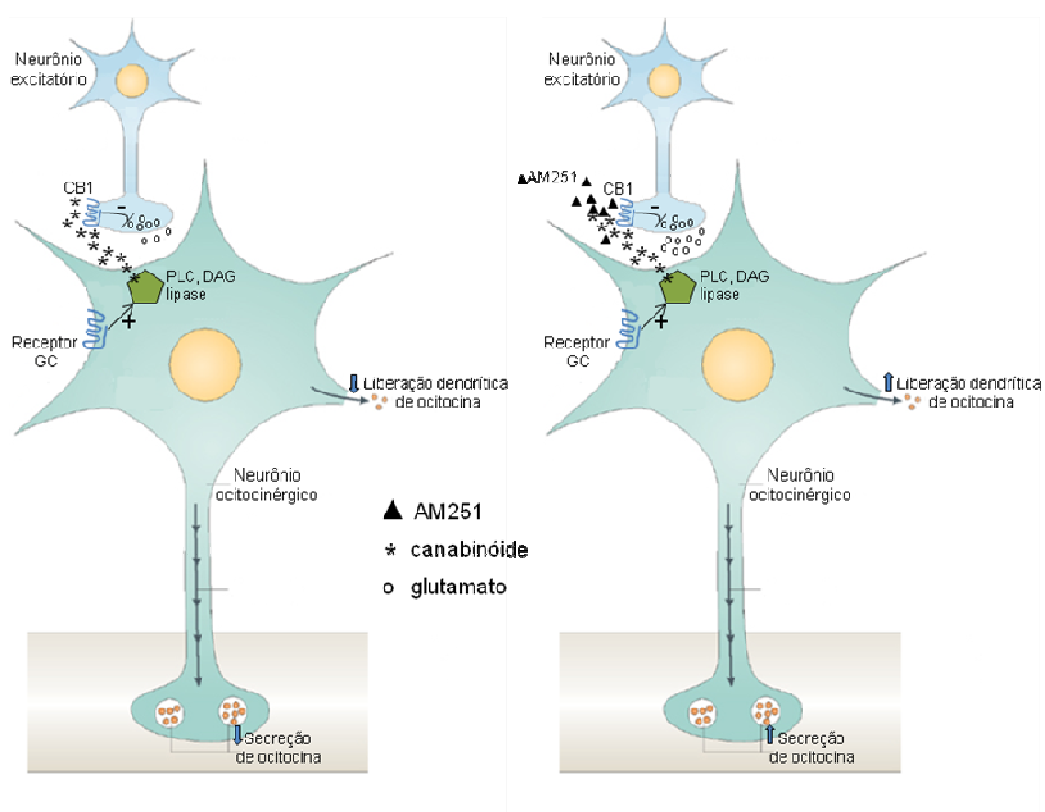


Figura 30: Esquema do modelo proposto para a participação dos endocanabinóides nos efeitos produzidos pelos glicocorticóides em neurônios magnocelulares e parvocelulares do PVN. Modificado de BRUNTON; RUSSELL 2008.

Resumindo, nossos estudos sugerem que os efeitos dos glicocorticóides sobre as respostas neuroendócrinas e comportamentais em ratas lactantes são mediadas pelos endocanabinóides, pois o AM251 reverteu os efeitos da dexametasona em ratas lactantes.

6.4 EFEITO DO WIN55,212-2 (AGONISTA DO RECEPTOR CB1) SOBRE AS RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS E COMPORTAMENTAIS EM RATAS LACTANTES

Para comprovarmos nossa hipótese, nós utilizamos um agonista sintético do receptor CB1 e vimos que o tratamento com WIN55,212-2 reduziu o comportamento materno, bem como o comportamento agressivo e a ansiólise maternal. Além disso, o tratamento com a dexametasona reduziu o número de células positivas para c-Fos na BST e no MnPOd e, diminuiu o número de células positivas para c-Fos nos neurônios ocitocinérgicos do PVN e SON. Avaliou-se também o ganho de peso da ninhada e foi observado uma diminuição no ganho de peso da ninhada das ratas que foram tratadas com WIN55,212-2.

Nossos resultados corroboram com um único estudo que correlacionou os canabinóides com ratas lactantes. Neste estudo, foi administrado um canabinóide exógeno, o THC, e foi demonstrada uma diminuição na ejeção de leite mediada pela ocitocina (TYREY; MURPHY, 1988). Portanto, estes dados suportam nossa hipótese de que os efeitos dos glicocorticóides são mediados pelos endocanabinóides.



7. CONCLUSÃO

Glicocorticóides suprimem as respostas comportamentais e neuroendócrinas em ratas lactantes. Estes efeitos dos glicocorticóides podem ser mediados por endocanabinóides atuando via receptor CB1.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBUD, R. et al. Lactation-induced deficits in NMDA endoreceptor- mediated cortical and hippocampal activation: changes in NMDA receptor gene expression and brainstem activation. **Molecular Brain Research**, v. 25, p. 323-332, 1994.

ADAMS, I. B.; MARTIN, B. R. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. **Addiction**, v. 91, p. 1585-1614, 1996.

ALMEIDA, D. R. M. M.; LUCION, A. B. 8-OH-DPAT in the median raphe, dorsal periaqueductal Gray and corticomedial amygdala nucleus decreases, but the medial septal area it can increase maternal aggressive behavior in rats. *Psychopharmacology* 134:392-400, 1997.

ALTEMUS, M. et al. Suppression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress in lactating women. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 80, p. 2954-2959, 1995.

AMERI, A. et al. Effects of the endogenous cannabinoid, anandamide, on neuronal activity in rat hippocampal slices. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 8, p. 1831-1839, 1999.

ANTUNES-RODRIGUES, J. C. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 169-208, 2004.

AVANZINO, G. L. et al. Effects of corticosterone on neurons of reticular formation in rats. **American Journal of Physiology**, v. 253, p. 25-30, 1987.

BAEZ, M. et al. Corticosterone is involved in foot shock-induced inactivity in rats. **Physiology and Behavior**, v. 60, p. 795-801, 1996.

BAEZ, M.; VOLOSIN, M. Corticosterone influences forced swim induced immobility. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, p. 729-736, 1994.

BARNA, I. et al. The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation: in vivo and in vitro studies in CB1 receptor knockout mice. **Life Science**, v. 75, p. 2959-2970, 2004.

BEN-JONATHAN, N.; HNASKO, R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. **Endocrinology Reviews**, v. 22, p. 724-763, 2001.

DERIJK, R. et al. The immune-hypothalamo-pituitary adrenal axis and autoimmunity. **International Journal of Neuroscience**, v. 59, p. 91-100, 1991.

BERTÓK, L. Endotoxins and endocrine system. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 305-308, 1998.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Behavioral correlates of chronic dominance-subordination relationships of male rats in a seminatural situation. **Neuroscience Biobehavioral Review**, v. 14, p. 455-462, 1991.

BLANCHARD, R. J., BLANCHARD, D. C. **The organization and modeling of animal aggression: The biology of aggression**. Alphen an den Rijn The Netherlands: Sijthoff and Noordhoff, 1981.

BÓKONY, V. et al. Stress response and the value of reproduction: are birds prudent parents? **American Naturalist**, v. 173, p. 589-598, 2009.

BOSCH, O. J. et al. Prenatal stress increases HPA axis activity and impairs maternal care in lactating female offspring: implications for postpartum mood disorder. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 3, p. 267-78, 2007.

BOSCH, O. J. et al. Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 29, 6807-6815, 2005.

BOSCH, O. J. et al. Maternal Behaviour is Associated with Vasopressin Release in the Medial Preoptic Area and Bed Nucleus of the Stria Terminalis in the Rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v.5, p. 420-429, 2010.

BOSCH, O. J. Maternal nurturing is dependent on her innate anxiety: the behavioral roles of brain oxytocin and vasopressin. **Hormonal Behavior**, v. 59, p. 202-212, 2011.

BOSCH, O. J.; NEUMANN, I. D. Brain vasopressin is an important regulator of maternal behavior independent of dams' trait anxiety. **Proceedings National Academy of Science USA**, v. 105, p. 17139-17144, 2008.

BRAIN, P. F. Differentiating types of attack and defensive in rodents. **Multidisciplinary Approaches to Aggression Research Amsterdam**, p. 53-78, 1981.

BRENT, N. et al. Metyrapone restores the febrile response to Escherichia coli LPS in pregnant rats. **American Journal of Physiology, Regulatory, Integratory, Comparative Physiology**, v. 300, p. 1588-1595, 2011.

BRIDGES, R. S. et al. Central prolactin infusion stimulates maternal behavior in steroid treated nulliparous female rats. **Proceedings National Academy of Science USA**, v. 87, p. 8003-8007, 1990.

BRIDGES, R. S. et al. Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. **Science**, v. 227, p. 782-784, 1985.

BRUNTON, P. J. et al. Endogenous opioids and attenuated hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune challenge in pregnant rats. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 21, 5117-5126, 2005.

BRUNTON, P. J. et al. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, p. 764-776, 2008.

BRUNTON, P. J., RUSSELL, J. A. Attenuated hypothalamo-pituitary-adrenal axis responses to immune challenge during pregnancy: the neurosteroid-opioid connection. **Journal of Physiology**, v. 586, p. 369-375, 2008.

- CALDJI, C. et al. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proceedings National Academy of Science USA**, v. 95, p. 5335-5340, 1998.
- CALIXTO, A. V. et al. Nitric oxide may underlie learned fear in the elevated T-maze. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 1, p. 37-42, 2001.
- CALVO, N. et al. Metyrapone pretreatment prevents the behavioral and neurochemical sequelae induced by stress. **Brain research**, v. 800, n. 2, 227-235, 1998.
- CALVO, N.; VOLOSIN, M., Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors are involved in the facilitation of anxiety-like response induced by restraint. **Neuroendocrinology**, v. 73, p. 261-271, 2001.
- CHAMPAGNE, A. F. et al. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology and Behavior**, v. 79, p. 359-371, 2003.
- CHOZICK, B. S. The behavioral effects of lesions of the amygdala: a review. **International Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 205-221, 1986.
- CONSIGLIO, A. R. et al. Effects of oxytocin microinjected into the central amygdaloid nucleus and bed nucleus of stria terminalis on maternal aggressive behavior in rats. **Physiology and Behavior**, v. 85, p. 354-362, 2005.
- CONSIGLIO, A. R.; BRIDGES, R.S. Circulating prolactin, MPOA prolactin receptor expression and maternal aggression in lactating rats. **Behavioral Brain Research**, v. 197, n. 1, p. 97-102, 2009.
- CONTE-DEVOLX, B. et al., Effects of metyrapone infusion on corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin secretion into the hypophysial portal blood of conscious, unrestrained rams. **Acta Endocrinologica**, v. 127, n. 5, 435-440, 1992.
- CUI, K. et al. Effects of endogenous glucocorticoid secretion on the interleukin 6 response to bacterial endotoxin in pregnant and non-pregnant rats. **Journal of Endocrinology**, v. 209, n. 1, 95-103, 2011.
- DA COSTA, A. P. C. et al. Region-specific reduction in stress-induced c-fos mRNA expression during pregnancy and lactation. **Brain Research**, v. 742, p. 177-184, 1996.
- DE LAURENTIIS, A. The hypothalamic endocannabinoid system participates in the secretion of oxytocin and tumor necrosis factor-alpha induced by lipopolysaccharide. **Journal of Neuroimmunology**, v. 221, n. 1, p. 32-41, 2010.
- DEVANE, W. A. et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular and Pharmacology**, v. 34, p. 605-613, 1988.

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

DI MARZO, V. The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. **Pharmacological Research**, v. 60, p. 77-84, 2009.

DI, S. et al. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. **Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 4850-4857, 2003.

DI, S. et al. Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and γ -aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. **Endocrinology**, v. 146, p. 4292-4301, 2005.

DI, S. et al. Activity-dependent release and actions of endocannabinoids in the rat hypothalamic supraoptic nucleus. **Journal of Physiology**, v. 15, n. 569, p. 751-760, 2005.

DOHLER, K. D. The pre-and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. **International Review Cytology**, v. 131, p. 1-57, 1991.

DROUET, J. B. Metyrapone blunts stress-induced hyperthermia and increased locomotor activity independently of glucocorticoids and neurosteroids. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, p. 1299-1310, 2010.

DURLO; F. V. et al. Interaction of prolactin, ANPergic, oxytocinergic and adrenal systems in response to extracellular volume expansion in rats. **Experimental Physiology**, v. 89, n. 5, 541-548, 2004.

ELLIOTT, J. C. et al. Acute cocaine alters oxytocin levels in the medial preoptic area and amygdala in lactating rat dams: implications for cocaine-induced changes in maternal behavior and maternal aggression. **Neuropeptides**, v. 35, p. 127-134, 2001.

FAHRBACH, S. E. et al. Possible role for endogenous oxytocin in estrogen-facilitated maternal behavior in rats. **Neuroendocrinology**, v. 40, p. 526-532, 1985.

FALKENSTEIN, E. et al. Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacological Review**, v. 52, p. 513-556, 2000.

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

FERREIRA, A. et al. Behavior of mother rats in conflict tests sensitive to antianxiety agents. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, p. 193-203, 1989.

FFRENCH-MULLEN, J. M. Cortisol inhibition of calcium currents in guinea pig hippocampal CA1 neurons via G-protein-coupled activation of protein kinase C. **Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 903-911. 1995.

- FINDLAY, A. L. R. Sensory discharges from lactating mammary glands. **Nature**, v. 211, p. 1183-1184, 1966.
- FLEMING, A. S.; ROSENBLATT, J. S. Olfactory regulation of maternal behavior in rats: I. Effects of olfactory bulb removal in experienced and inexperienced lactating and cycling females. **Journal of Comparative. Physiological. Psychology**, v. 86, p. 221-232, 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.
- FLEMING, A.S.; LUEBKE, C. Timidity prevents the nulliparous female from being a good mother. **Physiology and Behavior**, v. 27, p. 863-868. 1981.
- FRANCIS, D. D. Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 12, p. 1145-1148, 2000.
- FREEMAN, M. E. et al. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. **Physiological Reviews**, v. 80, p. 1523-1631, 2000.
- FREUND, T. F. et al. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 1017-1066, 2003.
- GAMMIE, S. C.; NELSON, R. J. cFOS and pCREB activation and maternal aggression in mice. *Brain Research*, v. 898, p. 232-241, 2001.
- GAONI, Y.; MECOULAM, R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of American Chemical Society**, v. 86, p. 1646-1647, 1964.
- GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. **Physiological Reviews**, v. 81, p. 629-683, 2001.
- GINSBERG, A. B. et al. Rapid alteration of stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal hormone secretion in the rat: a comparison of glucocorticoids and cannabinoids. **Stress**, v. 13, p. 248-257, 2010.
- GIOVENARD, M. et al. Neonatal handling increases fear and aggression in lactating rats, **Physiology and Behavior**, v. 86, 209-217, 2005.
- GIOVENARDI, M. et al., Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. **Physiology and Behavior**, v. 63, p. 351-359, 1998.
- GRAEFF, F.G. et al. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience Biobehavior Reviews**, v. 23, p. 237-246, 1998.
- GROSVENOR, C. E. et al. Comparison of plasma profiles of oxytocin and prolactin following suckling in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 43, p. 679-685, 1986.

- GROSVENOR, C. E.; MENA, F. Effect of underfeeding upon the rate of milk ejection in the lactating rat. **Journal of Endocrinology**, v. 2, p. 215-222, 1983.
- GROTA, L. J.; ADER, R. Continuous recording of maternal behavior in *Rattus norvegicus*. **Animal Behavior**, v. 17, p. 722-729, 1969.
- GUBERNICK, D. J., ALBERTS, J. R. Maternal licking of young: resource exchange and proximate controls. **Physiology Behavior**, v. 5, p. 593-601, 1983.
- GUBERNICK, D. J.; KLOPFER, R. S. (Eds). Parental Care in Mammals. New York: **Plenum Press**, 1981.
- BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune–neuro–endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, p. 64-102, 1996.
- HADDAD, J. J. et al. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 133, p. 1-19, 2002.
- HALEEM, D.J. et al. Adaptation of female rats to stress: shift to male pattern by inhibition of corticosterona. **Brain Research**, v. 458, n. 2, p. 339-347, 1988.
- HARRISON, R. W. et al. Heterogeneity of AtT-20 cell glucocorticoid binding sites: evidence for a membrane receptor. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 117, p. 423-440, 1979.
- HEALY, D. G. et al. Metyrapone displays antidepressant-like properties in preclinical paradigms. **Psychopharmacology**, v. 145, p. 303-308, 1999.
- HERMAN, J. P. et al. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. **Critical Reviews in Neurobiology**, v. 10, p. 371-394, 1996.
- HERMAN, J. P.; MORRISON, D. G. Immunoautoradiographic and in situ hybridization analysis of corticotropin-releasing hormone biosynthesis in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 11, p. 49-56, 1996.
- HERMAN, J. P. et al. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo- pituitary-adrenocortical responsiveness. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 24, n. 3, p. 151-180, 2003.
- HIGUCHI, T. et al. Detailed analysis of blood oxytocin levels during suckling and parturition in the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 110, p. 251-256, 1986.
- HIGUCHI, T. et al. Release of oxytocin during suckling and parturition in the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 105, p. 339-346, 1985.
- HILL, M. N.; MCEWEN, B. S. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, p. 791-797, 2010.

HILLARD, C. J. Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 61, n. 1-2, 3-18, 2000.

HOFFMAN, G. E. et al. Use of Fos- related antigens (FRAs) as markers of neuronal activity: FRA changes in dopamine neurons during proestrus, pregnancy and lactation. **Brain Research**, v. 654, p. 207-215, 1994.

HUA, S. Y.; CHEN, Y. Z. Membrane receptor-mediated electrophysiological effects of glucocorticoid on mammalian neurons. **Endocrinology**, v. 124, p. 687-691, 1989.

HUNTINGFORD, F. A. Animals fight but do not make war. In: Groebel, J., Hinde, R. A. Aggression and war – their biological and social bases. Cambridge, **Cambridge University Press**, 1989.

INSEL, T. R. Oxytocin—a neuropeptide for affiliation: evidence from behavioral, receptor autoradiographic, and comparative studies. **Psychoneuroendocrinology**, v. 17, p. 3-35, 1992.

JENKINS, J. S. Inhibition of adrenal steroid 11-oxygenation in the dog. **Science**, v. 128, 1958.

JOHNS, J. M. Chronic cocaine treatment alters social/aggressive behavior in Sprague-Dawley rat dams and in their prenatally exposed offspring. **Annals of the NY Academic Science**, v. 846, p. 399-404, 1998.

JONES, M. T.; Gillham, B. Factors involved in the regulation of adrenocorticotrophic hormone/beta-lipotrophic hormone. **Physiological Reviews**, v. 68, p. 743-818, 1988.

JOHNSTONE, H. A. Attenuation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: changes in feedforward and feedback mechanisms. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 12, n. 8, p. 811-822, 2000.

KELLER-WOOD, M. E.; DALLMAN, M. F. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. **Endocrine Reviews**, v. 5, p. 1-24, 1984.

KEMBLE, E. D. et al. Effects of regional amygdaloid lesions on flight and defensive behaviors of wild black rats (*Rattus rattus*). **Physiology and Behavior**, v. 48, p. 1-5, 1990.

KENDRICK, K. M. et al. Oxytocin, amino acid and monoamine release in the region of the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis of the sheep during parturition and suckling. **Brain Research**, v. 569, p. 199-209, 1992.

KENDRICK, K. M. Oxytocin, motherhood and bonding. **Experimental Physiology**, v. 85, p. 111-124, 2000.

KENT, S. et al. Sickness behavior: a new target for drug development. **Trends in pharmacological science**, v. 13, n. 1, p. 24-28, 1992.

KLOET, E. R. Stress in the brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 29, n. 405, p. 187-198, 2000.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiological Reviews**, v. 71, p. 93-127, 1991.

KRUGERS, H. J. et al. The corticosterona synthesis inhibitor metyrapone prevents hypoxia/ischemia induced loss of synaptic function in the rat hippocampus. **Stroke**, v. 31, p. 1162-1172, 2000.

KUSHNER, I. The acute phase response: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 163, p. 373-383, 1988.

LANDGRAF, R.; NEUMANN, I. D. Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 25, p. 150-176, 2004.

LAUAND, F. et al. Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation. **Neuroscience**. v. 15, n. 147, p. 247-257, 2007.

LEE, H. J. et al. Oxytocin: the great facilitator of life. **Progress in Neurobiology**, v. 88, p. 127-151, 2009.

LENG, G. et al. Oxytocin and the maternal brain. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, p. 731-734, 2008.

LICINIO, J.; FROST, P. The neuroimmune-endocrine axis: pathophysiological implications for the central nervous system cytokines and hypothalamus-pituitary-adrenal hormone dynamics. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 10, p. 1141-1148, 2000.

LIGHTMAN, S. L. et al. Lactation: a physiological model of stress hyporesponsiveness of the neuroendocrine system. In: Levy A, Grauer E, Ben-Nathan D, de Kloet ER, eds. **New Frontiers in Stress Research: Modulation of Brain Function**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers 59-71, 1998.

LONSTEIN, J. S. Regulation of anxiety during the postpartum period. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 28, p. 115-141, 2007.

LONSTEIN, J. S.; GAMMIE S. C. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 8, 869-888, 2002.

LUBIN, D. A. et al. An oxytocin antagonist infused into the central nucleus of the amygdala increases maternal aggressive behavior. **Behavioral Neuroscience**, v. 117, p. 195-201, 2003.

LUCAS, B. K. et al. Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. **Endocrinology**, v. 139, 4102-4107, 1998.

- MACKIE, K. Signaling via CNS cannabinoid receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 286, p. 60-65, 2008.
- MAIER, S. F. et al. Interleukin-1 mediates the behavioral hyperalgesia produced by lithium chloride and endotoxin. **Brain Research**, v. 623, n. 2, p. 321-324, 1993.
- MALCHER-LOPES, R. et al. Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 6643-6650, 2006.
- MANN, P. E. Finasteride delays the onset of maternal behavior in primigravid rats. **Physiology Behavior**. v. 88, p. 333-338, 2006.
- MATTHEY, S. Diagnosing postpartum depression in mothers and fathers: whatever happened to anxiety? **Journal of Affective Disorders**. v. 74, p. 139-147, 2003.
- MATTSON, B. J. et al. Comparison of two positive reinforcing stimuli: pups and cocaine throughout the postpartum period. **Behavioral Neuroscience**, v. 115, p. 683-694, 2001.
- 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.
- MCCORMICK, C. M. et al. Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. **Brain Research, Development Brain Research**, v. 84, p. 55-61, 1995.
- MCEWEN B. S. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, p. 108-214, 2000.
- MCEWEN, B. S., SEEMAN, T. Protective and damaging effects of mediators of stress mediators: central role of the brain. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 8, n. 4, 367-381. 2006.
- MECHOULAM, R. in **Cannabis as Therapeutic Agent** (ed. Mechoulam, R.). Press Roca Ranton, p.1-19, 1986.
- MELO, A. I. et al. Effects of prolactin deficiency during the early postnatal period on the development of maternal behavior in female rats: mother's milk makes the difference. **Hormones and Behavior**, v. 56, p. 281-229, 2009.
- MIKICS, E. et al. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effect in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. **Hormones and behavior**, v. 48, n. 2, p. 152-162, 2005.
- MOOS, F. et al. Release of oxytocin within the supraoptic nucleus during the milk ejection reflex in rats. **Experimental Brain Research**, v. 76, p. 593-602, 1989.

- MOUSA, S. et al. Corticosteroid modulation and stress-induced analgesia in rats. **Neuroendocrinology**, v. 33, n. 5, p. 317-319, 1981.
- MUNK-OLSEN, T., et al. New parents and mental disorders: a population-based register study. **JAMA**, v. 296, p. 2582-2589, 2006.
- MUNRO, S. et al. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, p. 61-65, 1993.
- MYERS, M. M. et al. Maternal behavior of SHR rats and its relationship to offspring blood pressures. **Developmental Psychobiology**, v. 22, p. 29-53, 1989.
- NAVARRO, M. et al. Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR141716A induces anxiety-like responses in the rat. **Neuroreport**, v. 8, 491-496, 1997.
- NEUMANN, I. et al. Simultaneous microdialysis in blood and brain: oxytocin and vasopressin release in response to central and peripheral osmotic stimulation and suckling in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 58, p. 637-645, 1993.
- NEUMANN, I. et al. Maternal defence as an emotional stressor in female rats: correlation of neuroendocrine and behavioural parameters and involvement of brain oxytocin. **European Journal of Neuroscience**, v. 13, p. 1016-1024, 2001.
- NEUMANN, I. et al. Increased basal activity of the hypothalamopituitary- adrenal axis during pregnancy in rats bred for high anxiety-related behaviour. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, p. 449-463, 1998.
- NEUMANN, I. D. Stimuli and consequences of dendritic release of oxytocin within the brain. **Biochem Soc Trans**, v. 35, p. 1252-1257, 2007.
- NEUMANN, I. D. et al. Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adeno-hypophysial changes. **Journal of Physiology**, v. 508, p. 289-300, 1998.
- NEUMANN, I. et al. Oxytocin and vasopressin release within the supraoptic and paraventricular nuclei of pregnant, parturient and lactating rats: a microdialysis study. **Neuroscience**, v. 53, p. 65-75, 1993.
- NEUMANN, I. D. et al. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. *Neuroscience*. 95, 567-575. 2000.
- NUMAN, M. A neural circuitry analysis of maternal behavior in the rat. **Acta Paediatrica Supplement**, v. 397, p. 19-28, 1994.
- NUMAN, M. Maternal behavior: In: Knobil, E.; Neill, J. D., eds. **The physiology of reproduction**, 2 ed. New York: Raven Press. Cap 37, p. 221-302, 1994.

- OLIVER, C. Effects of metyrapone infusion on corticotrophin- releasing factor and arginine vasopressin secretion into the hypophysal portal blood of conscious, unrestrained rams. **Acta Endocrinologica**, v. 125, p. 435-440, 1992.
- ORCHINIK, M. et al. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. **Science**, v. 252, p. 1848-1851, 1991.
- PACAK, K., PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocrinology Reviews**, v. 22, n. 4, 502-548, 2001.
- PAGOTTO, U. et al., Normal human pituitary adenomas express cannabinoid receptor type 1 and synthesize endogenous cannabinoid: first evidence for a direct role of cannabinoids on hormone modulation at the human pituitary level. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 86, p. 2687-2696, 2001.
- PATEL, S. et al., Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocrinology**, v. 145, p. 5431-5438, 2004.
- PATEL, S. Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 1057-1069, 2005.
- PI, X. J.; GRATTAN, D. R. Increased expression of both short and long form of prolactin receptor mRNA in hypothalamic nuclei of lactating rats. **Journal of Molecular and Endocrinology**, v. 23, p. 13-22, 1999.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3-33, 2003.
- RAMACHANDRA, R. N. et al. Neuro-hormonal host defence in endotoxin shock. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 6, n. 2, p. 157-169, 1992.
- RIVEST, S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. **Brain Behavior Immunity**, v. 17, n. 1, p. 13-9, 2003.
- RIVIER, C. et al. In the mouse, the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by a lipopolysaccharide (endotoxin) is mediated through interleukin-1. **Endocrinology**, v. 125, p. 2800-2805, 1989.
- RIVIER, C.; SHEN, G. H. In the rat, endogenous nitric oxide modulates the response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to interleukin-1 beta, vasopressin, and oxytocin. **Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 1985-1993, 1994.
- ROSENBLATT, J. S. et al. Relationship between maternal aggression and maternal care in the rat. **Aggressive Behavior**, v. 20, p. 243-255, 1994.
- ROTHWELL, N. J. et al. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. **Trends in Pharmacological Science**, v. 12, p. 430-435, 1991.

ROTLLANT, D.; ARMARIO, A. A single dose of metyrapone caused long-term dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Neuroscience**, v. 130, p. 427-434, 2005.

ROTLLANT, D. et al. Evidence that metyrapone can act as a stressor: effect on pituitary-adrenal hormones, plasma glucose and brain c-fos induction. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 4, p. 693-700, 2002.

RUGINSK, S. G. et al. Central actions of glucocorticoids in the control of body fluid homeostasis: review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 61-67, 2009.

RUGINSK, S. G. et al. CB(1) modulation of hormone secretion, neuronal activation and mRNA expression following extracellular volume expansion. **Experimental Neurology**, v. 224, n. 1, p. 114-22, 2010.

RUGINSK, S. G. et al. Glucocorticoid modulation of neuronal activity and hormone secretion induced by blood volume expansion. **Experimental Neurology**, v. 206, n. 2, p. 192-200, 2007.

SCHULKIN, J. In: The neuroendocrine regulation of behavior. London: **Cambridge University Press**, 1999.

SEYFRIED, L. S.; MARCUS, S. M. Postpartum mood disorders. **International Review of Psychiatry**, v. 15, p. 231-242, 2003.

SHANKS N., et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to endotoxin is attenuated during lactation. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 11, p. 857-865, 1999.

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

SLAMBEROVÁ, R. et al. Repeated morphine administration during pregnancy attenuates maternal behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, p. 565-576, 2001.

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

STERN, J. M. Pituitary-adrenal responsiveness during lactation in rats. **Neuroendocrinology**, v. 12, p. 179-191, 1973.

SUYEMITSU, T.; TERAYAMA, H. Specific binding sites for natural glucocorticoids in plasma membranes of rat liver. **Endocrinology**, v. 96, p. 1499-1508, 1975.

TASKER, J. G.; HERMAN, J. P. Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Stress**, v. 14, n. 4, p. 398-406, 2011.

TASKER, J. et al. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, 5549-5556, 2006.

TAYA, K.; GREENWALD, G. S. Mechanisms of suppression of ovarian follicular development during lactation in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 1090-1101, 1982.

TAYA, K.; SASAMOTO, S. Inhibitory effects of corticotrophin releasing factor and endorphin on LH and FSH secretion in the lactating rat. **Journal of Endocrinology**, v. 120, p. 509-515, 1989.

TAYA, K.; SASAMOTO, S. Involvement of the adrenal gland in the suckling-induced decrease in LH and FSH secretion and the concomitant increase in prolactin secretion in the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 125, p. 279-285, 1990.

TILDERS, F. J. H., et al. Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, n. 2, p. 209-32, 1994.

TORNER, L. et al. Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. **European Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 1381-1389, 2002.

TORNER, L. et al., Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. **Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 3207-3214, 2001.

TORNER, L.; NEUMANN, I. D. The brain prolactin system: involvement in stress response adaptations in lactation. **Stress**, v. 5, p. 249-257, 2002.

TRIBOLLET, E. et al. Autoradiographic localization of vasopressin and oxytocin binding sites in rat kidney. **Kidney International**, v. 33, p. 959-965, 1988.

TRIBOLLET, E. et al. Oxytocin receptors in the central nervous system. **Annals the NY Acadademy of Science**, v. 652, p. 29-38, 1992.

TUREY, F. W.; VAN CAUTER, E. **Rhythms in reproduction**. The physiology of reproduction, 2. ed., New York: Raven-Press, p. 571-628. 1993.

TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. Regulation of the HPA axis by cytokines. **Brain Behavior and Immunity**, v. 9, p. 253-275, 1995.

TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 2-71, 1999.

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.

VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. **The American Journal of Psychology**, v. 83, n. 1, p. 103-111, 1970.

- VALLEE, M. et al. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. **Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 2626-2636, 1997.
- VAN DE KAR, L. D. et al. Stress: neuroendocrine and pharmacological mechanisms. **Methods Achiev. Experimental and Pathology**, v. 14, p. 133-173, 1991.
- VAN LEENGOED, E. et al. Inhibition of postpartum maternal behaviour in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. **Journal of Endocrinology**, v. 112, p. 275-282, 1987.
- VEIGA, C. P. et al. Effect of 5-HT 1B receptor agonists injected into the prefrontal cortex on maternal aggression in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 825-830, 2007.
- VEINANTE, P.; FREUND-MERCIER, M. J. Distribution of oxytocin- and vasopressin-binding sites in the rat extended amygdala: a histoautoradiographic study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 383, p. 305-325, 1997.
- VIANA, M. B. et al. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 3, p. 549-554, 1994.
- VILELA, F.C., GIUSTI-PAIVA, A. Glucocorticoids disrupt neuroendocrine and behavioral responses during lactation. **Endocrinology**. DOI: 10.1210/en.2011-1096, 2011.
- VILELA, F.C. et al. Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 325-327, 2009.
- VOOGT, J. L. et al. Influence of cycling, pregnancy, labor, and suckling on corticosterone-ACTH levels. **American Journal of Physiology**, v. 216, p.655-658, 1969.
- WAKERLEY, J. B. et al. **Milk ejection and its control**. The Physiology of Reproduction, 2. Ed. New York: Raven Press, p. 1131-117, 1996.
- WALSH, R. J. et al. Receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. **Endocrinology**, v. 120, p.1846-1850, 1987.
- WEINBERG, M. K. et al. Effects of maternal depression and panic disorder on mother-infant interactive behavior in the face-to-face still-face paradigm. **Infant Mental Health**, v. 29, p. 472-491, 2008.
- WEINSTOCK, M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. **Progress in Neurobiology**, v. 65, p. 427-451, 2001.
- WIESNER, B. P.; SHEARD, N. M. **Maternal behaviour in the rat**. Edinburgh: Oliver & Boyd, 1933.
- WILLIAMSON, D. G.; O'DONNELL, V. J. The interaction of Metopirone with adrenal mitochondrial cytochrome p-450. A mechanism for the inhibition of adrenal 11 β -hydroxylation. **Biochemistry**, v. 8, p. 1306-1311, 1969.

WINDLE, R. J. et al., Endocrine and behavioural responses to noise stress: comparison of virgin and lactating female rats during non disrupted maternal activity. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 9, p. 407-414, 1997.

WINGFIELD, J. C.; SAPOLSKY, R. M. Reproduction and resistance to stress: when and how. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, p. 711-724, 2003.

WINTRIP, N. et al. The effect of lactation on induced Fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. **Brain Research**, v. 754, p. 113-120, 1997.

YIM, A. J. et al., A comparative study of morphine treatment regimen prior to mating and during late pregnancy. **Brain Research Bulletin**, v. 68, p. 384-391, 2006.

YOSHIDA, M. et al. Evidence that oxytocin exerts anxiolytic effects via oxytocin receptor expressed in serotonergic neurons in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 2259-2271, 2009.

YOSHIMURA, R. et al. Localization of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain. **Endocrinology**, v. 133, p. 1239-1246, 1993.



ANEXOS

Glucocorticoids Disrupt Neuroendocrine and Behavioral Responses during Lactation

Fabiana C. Vilela and Alexandre Giusti-Paiva

Laboratory of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfenas, Alfenas-MG, 37130-000, Brazil

The influence of glucocorticoids on the neuroendocrine system and behavior of lactating rats is not well known. To evaluate the effects of glucocorticoids on the neuroendocrine system and maternal and aggressive behavior, lactating female rats were treated with dexamethasone or vehicle for 2 h before experiments. Blood samples were collected 15 min after the beginning of suckling to evaluate hormonal changes. To evaluate the maternal behavior of lactating rats, eight pups were placed in their home cages on the side opposite the location of the previous nest, and the resulting behavior of the lactating rat was filmed for 30 min. Aggressive behavior was evaluated by placing a male rat (intruder) in the home cage. Dexamethasone treatment reduced oxytocin and prolactin secretion during lactation and reduced pup weight gain. Relative to control treatment, dexamethasone treatment also adversely affected a variety of maternal behaviors; it increased the latency to build a new nest, decreased the number of pups gathered to the nest, increased the latency to retrieve the first pup, and decreased the percentage of time spent in the arched-nursing position. Dexamethasone treatment, compared with control, also reduced aggressive behavior, as evidenced by an increase in the latency to the first attack, a reduction in the number of front and side attacks, and a decrease in lateral threat and biting. Taken together, our results suggest dexamethasone treatment in lactating rats disrupts prolactin and oxytocin secretion, and this is followed by an attenuation of maternal and aggressive behavior. (*Endocrinology* 152: 0000–0000, 2011)

Maternal behavior is probably the most important pro-social behavior of the mammalian mother, ensuring the well-being and development of her offspring, and interestingly, the maternal behavior in the lactating rat is high in the early phase of lactation but decreases with progression of motherhood (1, 2). The end of pregnancy and the onset of lactation are accompanied by the activation of neurobiological systems that are directly related to reproductive functions (3–5). During this period of time, the ultimate goal of a mother's behavior is to ensure the survival of herself and her pups (6). For this purpose, many other behaviors are inhibited, and the female is largely focused on her offspring. For a rat, maternal behaviors include nest building, lactation, pup licking and grooming, and pup retrieval and defense (1, 7–9). In addition, lactating female rats exhibit high levels of aggression during the first 2 wk after delivery, which is called maternal

aggression, to protect their pups from a male intruder to the nesting area (1, 10).

The maintenance of lactation depends on the persistence of the connection of the mother with her offspring (8, 9). Both prolactin and oxytocin are secreted from the pituitary gland under the regulatory control of the hypothalamus, are involved in lactation, and act as important components of the neurobiological pathways underlying the initiation and maintenance of maternal behavior (1, 3, 4). Suckling stimulates a rapid increase in plasma prolactin and oxytocin; however, these hormones are also secreted in response to several other stimuli, including increased plasma osmotic pressure, blood volume expansion, sexual intercourse, and a wide range of physical and psychological stressors (11). It has been demonstrated that glucocorticoids may reduce prolactin and oxytocin secretion (12). Glucocorticoids also decrease hypothalamic fos ex-

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in U.S.A.

Copyright © 2011 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/en.2011-1096 Received April 12, 2011. Accepted August 30, 2011.

Abbreviations: CNS, Central nervous system; HPA, hypothalamus-pituitary-adrenal; PVN, paraventricular nucleus; SON, supraoptic nucleus.

pression in response to volume expansion in isotonic and hypertonic conditions as well as osmotic, cholinergic, or angiotensinergic central stimulation in male rats (13, 14). This indicates that glucocorticoids may interfere with the secretion of other pituitary hormones related to maternal behavior (15, 16); however, the influence of glucocorticoids on the neuroendocrine system and the behavior of lactating rats is not well understood. Different studies report conflicting effects of glucocorticoid manipulation on maternal behavior; in some cases, the removal of the adrenal glands (the source of glucocorticoids) appears to be facilitatory (17) and, in other cases, inhibitory or disruptive (18, 19). Although several studies have focused on maternal and aggressive behavior, the influence of glucocorticoids on these behaviors remains to be elucidated. Because glucocorticoids can modulate prolactin and oxytocin secretion, our aim was to evaluate the influence of dexamethasone administration on maternal behavior, aggressive behavior, and hormonal changes in lactating rats.

Materials and Methods

Animals

Subjects were adult Wistar nulliparous female rats weighing 220–250 g and approximately 90 d of age at the beginning the experiments. The animals were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Alfnas and were housed in a temperature-controlled room (22 C), on a 12-h light, 12-h dark cycle (lights on at 0700 h) with access to water and food *ad libitum*. In all experiments, the females were timed-mated by placing them with sexually experienced males. The day when sperm was observed in the vaginal lavage was designated d 1 of pregnancy. Pregnant females were individually housed in opaque polypropylene cages (42 × 34 × 16 cm). After giving birth (d 0 of lactation), litters were randomly standardized to eight pups, and females were left with their litters until testing for maternal behavior, aggressive behavior, and hormonal changes on d 6 of lactation. To test the aggressive behavior of lactating females, male intruders were used. These males were about 2.5 months old, maintained under the same conditions, and weighed approximately the same as the resident female. Each intruder male was used only once during the experiment. All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki on the welfare of experimental animals and with the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Alfnas (no. 244/2009).

Milk ejection and hormonal measurement

Following the methods of Grosvenor and Mena (20), a milk ejection test was performed on d 6 of lactation. All pups were removed from their dams and placed in a warm nest. After 12 h of isolation, urine was manually expressed from the bladders of pups. The dams that had been pretreated with vehicle or dexamethasone (n = 6 per group) were treated with saline (1 ml/kg ip)

or oxytocin (1 µg/kg ip). Pups were weighed and returned to their dam for 15 min after onset of suckling and then reweighed to determine the amount of milk they obtained from the dam. At this time, the lactating rats were decapitated and blood was collected from the trunk (2.5 ml) in plastic tubes containing heparin and kept on ice. The plasma was separated by centrifugation (3000 rpm at 4 C for 15 min), and aliquots were kept at –20 C until hormonal measurement. Plasma hormone levels were determined by specific RIA, as previously described (12, 21). The assay sensitivity was 4.0 ng/ml for corticosterone, 0.9 pg/ml for oxytocin, and 0.4 ng/ml for prolactin. The intra- and interassay coefficients of variation were 5.7 and 8.4% for corticosterone, 6.8 and 12.6% for oxytocin, and 5.0 and 11.7% for prolactin, respectively. All samples from a single experiment were assayed in duplicate in the same assay.

Maternal behavior

Maternal behavior was assessed in the morning between 0800 and 1200 h. Initially, the position of the nest in the home cage was recorded. Next, the litter was removed from the cage and placed in another cage. Then, lactating rats (n = 7 per group) received treatment with dexamethasone (1 mg/kg ip) or saline (1 ml/kg ip). After 2 h, the pups were placed back in their home cages on the side opposite the location of the previous nest, and the dam's behavior was filmed for 30 min. We analyzed the following parameters: latency to retrieve each pup, time spent licking pups, percentage of time spent arched-nursing, percentage of time spent blanket-nursing, percentage of full maternal behavior (which is determined by the mother staying in the arched-nursing position for 2 min after nursing), and nonmaternal behavior, such as rearing and grooming of mother (22–24).

Aggressive behavior

Two hours after saline (1 ml/kg) or dexamethasone (1 mg/kg) injection, an adult male rat (intruder) was placed into the home cage of the female and her litter, and the interaction of the mother and intruder was filmed for 10 min. Over this 10-min period, the following parameters were analyzed: latency to first attack, frontal and lateral attack number, lateral threat, biting, grooming, and maternal behavior (*i.e.* any behavior directed toward caring for the pups) (25–28).

Statistical analysis

The data were analyzed using the GraphPad software program version 4.0 and expressed as mean ± SEM. Statistical comparisons were made using Student's *t* test or two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test, and *P* values <0.05 were considered significant.

Results

Figure 1 shows the plasma concentration of oxytocin, prolactin, and corticosterone in nonlactating and lactating rats after 12 h of isolation from pups (time zero) or 15 min after the onset of suckling. Suckling increased the secretion of prolactin and oxytocin in lactating rats treated with vehicle, but dexamethasone treatment reduced oxytocin

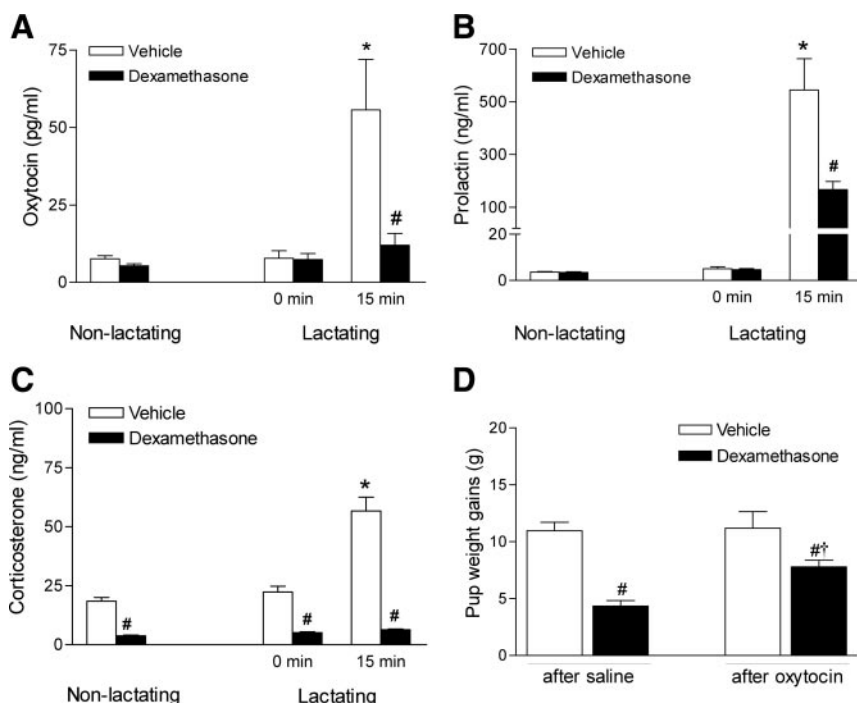


FIG. 1. Effects of the administration of dexamethasone (1 mg/kg ip) or vehicle (saline, 1 ml/kg ip) on hormone levels in lactating rats ($n = 7$) on d 6 of lactation. A, Oxytocin secretion; B, prolactin secretion; C, corticosterone secretion; D, weight gain in pups of dams that were treated with saline or oxytocin (1 μ g/kg). *, $P < 0.05$, when compared with control group (time zero); #, $P < 0.05$ when compared with vehicle group; †, $P < 0.05$ when compared with dexamethasone group treated with saline.

($P < 0.05$; Fig. 1A) and prolactin ($P < 0.05$; Fig. 1B) secretion during lactation. Corticosterone secretion also increased after suckling, and dexamethasone also blunted this increase ($P < 0.05$; Fig. 1C). Dexamethasone treatment did not change prolactin and oxytocin levels measured previously to suckling. Furthermore, dexamethasone treatment suppressed corticosterone levels in virgin and lactating rats. Dexamethasone administration reduced weight gain in pups ($P < 0.05$; Fig. 1D). However, oxytocin administration increased weight gain in pups of dams that were pretreated with dexamethasone ($P < 0.05$; Fig. 1D).

Behavioral analysis showed that dexamethasone treatment on d 6 of lactation increased the dam's nest-building latency, decreased the number of pups gathered to the nest (Fig. 2A), increased the retrieval latency for the first pup ($P < 0.05$; Fig. 2B), decreased time spent licking pups ($P < 0.001$; Fig. 2C), decreased the expression of full maternal behavior ($P < 0.01$; Fig. 2D), and decreased percentage of time spent in an arched-nursing position ($P < 0.001$; Fig. 2E). No significant differences were found in the amount of time spent blanket-nursing (Fig. 2F). Dexamethasone treatment also affected nonmaternal behavior; female rats treated with dexamethasone exhibited increases in the number of rearings and grooming time ($P < 0.001$, Fig. 2,

G and H, respectively) compared with saline-treated controls.

Dexamethasone treatment in female rats also reduced aggressive behaviors; it produced an increase in latency to the first attack ($P < 0.05$; Fig. 3A), a reduction in the number of front ($P < 0.001$, Fig. 3B) and side ($P < 0.05$, Fig. 3C) attacks, decreased lateral threat ($P < 0.01$; Fig. 3D), and decreased biting ($P < 0.01$; Fig. 3E). Additionally, mothers treated with dexamethasone showed a reduction in contact with pups (maternal behavior) compared with control treatment ($P < 0.001$; Fig. 3F) but did not show a significant alteration in the number of self-grooming events.

Discussion

The present study shows that dexamethasone reduces maternal behavior, reduces aggressive behavior, disrupts suckling-induced systemic oxytocin and prolactin secretion, and reduces milk ejection in lactating rats.

Pups suckling to obtain necessary nourishment cause a variety of hormonal changes in the mother (29, 30). The suckling stimulus increases the plasma concentrations of oxytocin (4, 5, 31), prolactin (9, 31–33), and corticosterone (34) while decreasing concentrations of LH and FSH (9, 31, 32). During suckling, the synthesis and release of both oxytocin and prolactin are controlled by a number of hypothalamic as well as posterior and anterior pituitary factors (33, 34, 35, 36). Because milk ejection occurs only during the peaks in plasma oxytocin, the decrease in oxytocin levels in lactating rats treated with dexamethasone could result in less milk transfer to the pups, possibly accounting for the lower average pup weight gains.

During lactation, there occurs a marked up-regulation of prolactin receptor expression in the choroid plexus and hypothalamus. In most hypothalamic nuclei, there is a significant increase in the number of prolactin receptor-immunoreactive neurons during lactation (37). Moreover, some hypothalamic nuclei, including the paraventricular and ventromedial nuclei (which do not express prolactin receptor protein in nonpregnant rats) contain significant prolactin receptor immunoreactivity during lactation. Clearly, these adaptations are critical for development and maintenance of lactation and suggest an effect of prolactin

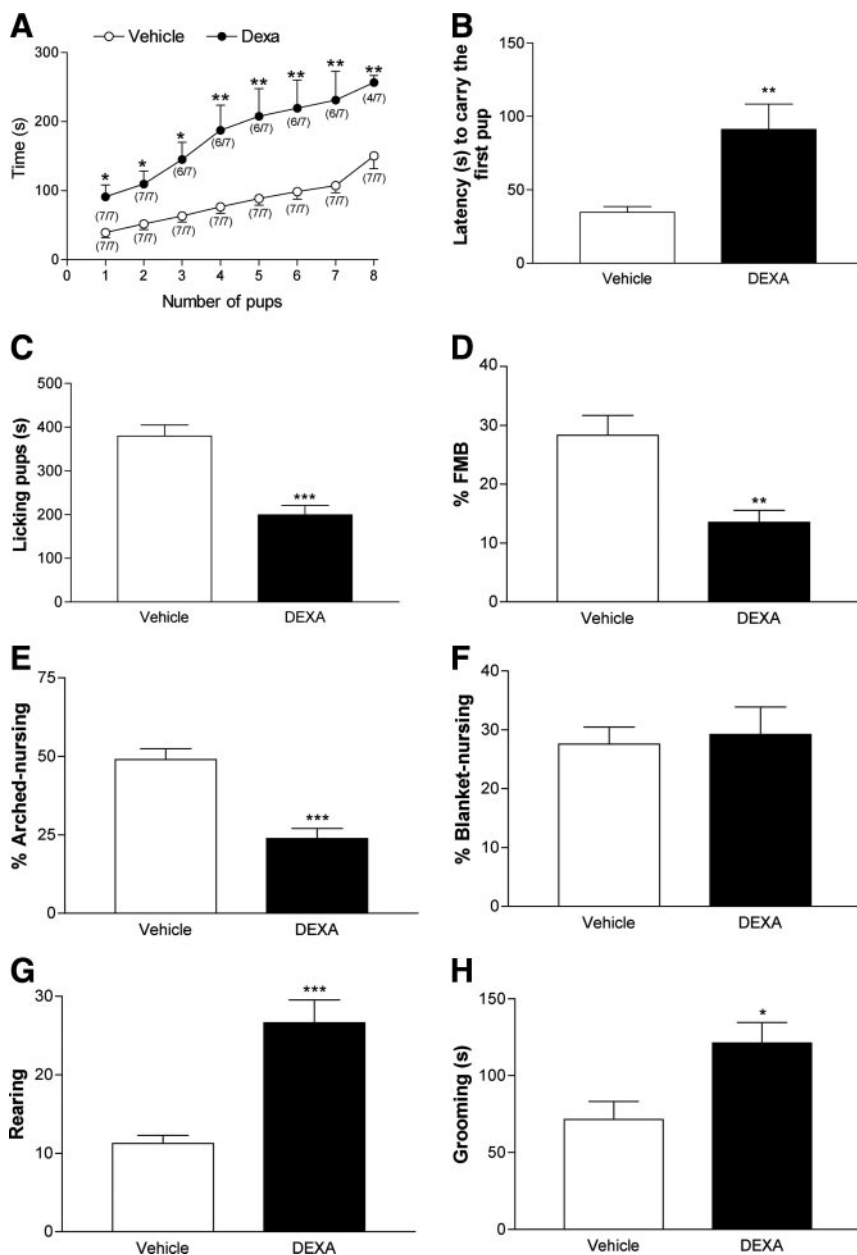


FIG. 2. Effects of the administration of the dexamethasone (1 mg/kg ip) or vehicle (1 ml/kg ip) on d 6 of lactation on maternal behavior in lactating rats ($n = 7$). A, Nest building; B, latency to carry of the first pup; C, licking pups; D, percentage of full maternal behavior (FMB); E, percentage of time spent in arched-nursing; F–H, percentage of time spent in blanket-nursing (F), rearing (G), and grooming (H). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, when compared with control group.

on the brain. In contrast to most other neuropeptides, prolactin that is secreted into the blood gains access to the brain through receptor-mediated active transport via choroid plexus cells (38). In addition to its well-known peripheral effects on the mammary glands, prolactin plays a significant role in the regulation of maternal behavior within the brain (3, 39, 40). Demonstrating this, prolactin administered into the medial preoptic area promotes the onset of maternal behavior (39). Confirmation of this behavioral function of prolactin also comes from studies

with prolactin receptor knockout mice; these mice show impaired or absent maternal behavior (41). In the rat, the chronic intracerebroventricular infusion of a selective prolactin receptor antisense oligodeoxynucleotide also impairs maternal behavior during lactation (15). These findings suggest that decreases in prolactin secretion mediate the disruption of maternal behavior induced by dexamethasone administration.

Suckling also induces oxytocin release (7, 42). Oxytocin synthesis mainly occurs in neurons of the paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON) of the hypothalamus. It is released from nerve terminals in the posterior pituitary and various other regions of the brain. Suckling stimulates the simultaneous release of oxytocin into the bloodstream and central nervous system (CNS) of lactating rats (7, 8, 42–44). Oxytocin release in response to suckling has been measured using microdialysis in the mediobasal hypothalamus, bed nucleus of the stria terminalis, medial preoptic area, and septum of parturient sheep (8, 43, 44). Oxytocin has also been measured in rats at the sites of origin, the PVN and SON (45). Neurally released oxytocin within the CNS has been implicated in regulation of reproductive, maternal, and affiliated behaviors and is a critical component of the integrated response to stress (46, 47). The CNS sites where oxytocin mediates these actions include several structures in the hypothalamus and limbic system that receive projections from hypothalamic oxytocin neurons and are components of regulatory networks controlling specific physiological and behavioral functions (47). Support for the role of endogenous oxytocin in regulating maternal behavior has come from studies showing that an oxytocin antagonist or antisera infused into the brain blocks the onset of maternal behavior in rats that have just given birth (48, 49). In addition to disrupting oxytocin secretion in response to suckling, dexamethasone reduced a variety of behaviors and underlying motivational states that, collectively, can be referred to as maternal behaviors.

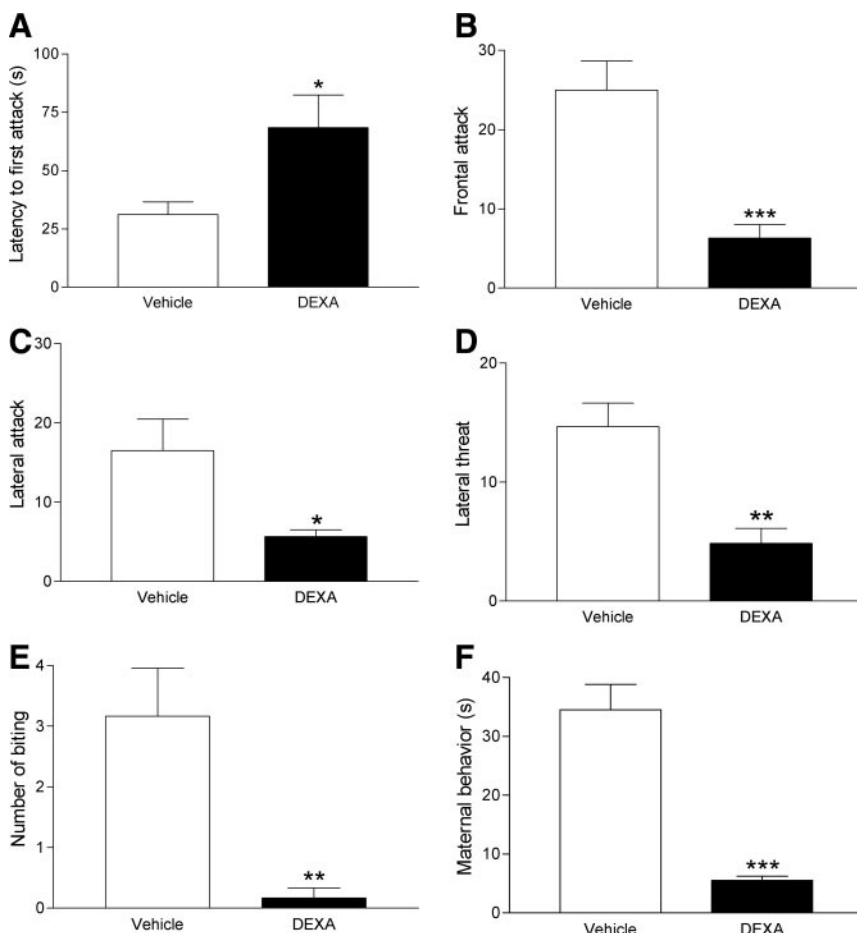


FIG. 3. Effects of the administration of the dexamethasone (1 mg/kg ip) or vehicle (1 ml/kg ip) on d 6 of lactation on maternal aggressive behavior in lactating rats ($n = 7$). A, Latency to first attack; B, frontal attack; C, lateral attack; D, lateral threat; E, number of biting incidents; F, maternal behavior. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, when compared with control group.

In addition, pharmacological manipulation of the oxytocin system within the central nucleus of the amygdala, bed nucleus of stria terminalis, and the parvocellular division of the PVN elicits changes in maternal aggression (10, 50–52). These areas are known to be involved in both aggressive (53–56) and maternal behaviors (26, 57, 58), and they exhibit a high density of oxytocin receptors (59) and exhibit an increase in oxytocin-induced excitation during lactation (60–62). Maternal aggression straddles the realms of maternity and defense, involving both a lactating female's motivation to nurture her offspring and her need to protect them from the infanticidal behavior of nonpaternal males (63). In many species, maternity brings about a new capacity for fierce displays of protective aggression. Females who might normally retreat from, or ignore, novel male conspecifics will vigorously attack them to defend their young (64). Maternal aggression is a key component of the array of behaviors females adopt when pups are born, and the influence of hormones, including glucocorticoids, in this response is still being

elucidated. Similar to other maternal behaviors, dexamethasone suppresses maternal aggression in lactating rats, and this effect may be mediated by oxytocin and prolactin.

Brain regions such as the olfactory system, the basal ganglia, the limbic system, the thalamus, the hypothalamus, and the brainstem express moderate to high levels of oxytocin receptors (33, 65–68), suggesting a convergence of behavioral and neuroendocrine pathways. Interestingly, circulating glucocorticoids exert regulatory effects on central oxytocin receptors, modulating their expression in many brain structures (69–71).

Glucocorticoids affect the neuroendocrine response to licking in lactating rats, and they are capable of disrupting not only oxytocin but also prolactin function. These effects echo the effect of dexamethasone on the endocrine response to isotonic or hypertonic blood volume expansion in male rats. Dexamethasone suppresses prolactin (13) and oxytocin secretion (15) induced by blood volume expansion. In addition, dexamethasone blunted oxytocin secretion and fos expression in magnocellular neurons of PVN and SON in male rats receiving osmotic, cholinergic, and angiotensinergic central stimulation (14).

Other studies suggest that glucocorticoid action on magnocellular neurons seems to be predominantly inhibitory. Some investigators have proposed that glucocorticoids could act on transmembrane G protein-coupled receptors to stimulate the release of endocannabinoids in the hypothalamus (72–74). Subsequently, the endocannabinoids could act as retrograde messengers that not only inhibit the release of glutamate but also stimulate the release of γ -aminobutyric acid (GABA), contributing to the decreased activity of both parvocellular and magnocellular hypothalamic neurons (75, 76). This hypothesis also suggests a mechanism by which glucocorticoids may suppress the hormonal response to suckling that is essential to promoting maternal behavior and lactation.

Under stressful conditions, glucocorticoids promote individual survival by modulating essential functions such as metabolism, immunity, and cardiovascular activity while simultaneously suppressing nonessential functions such as sexual and parental behavior and reproductive physiology (77). Consequently, several authors have sug-

gested that the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) response to stress might be down-regulated during periods of high investment in reproduction to protect against stress-induced disruptions of reproductive efforts (77, 78).

Consistent with this hypothesis, during lactation, the circadian variation in the HPA axis activity is dampened, and responses to stressors are attenuated (16, 79). Various stressful stimuli are less effectively able to stimulate the HPA axis during lactation in rats (16, 79). Decreases in stress-induced activation of the maternal HPA axis attenuate fluctuations in glucocorticoid levels. Glucocorticoid fluctuations limit the catabolic effects that would otherwise follow surges in glucocorticoid secretion, which in turn maintains the supply of milk-delivered energy to the offspring (16). In addition to their blunted HPA responses, lactating females of several species show reduced behavioral responses to stressors and diminished behavioral indices of anxiety. Postpartum rats show increased locomotion in the open field, increased time in the open arms of an elevated plus maze, reduced shock-induced aggression, and reduced frequency of fleeing from an intruder compared with nulliparous females (80–83). HPA axis adaptations during lactation are likewise expected to help limit glucocorticoid delivery to the young, protecting them against adverse developmental effects on the HPA system of excessive glucocorticoids (16). However, the effect of acute administration of glucocorticoids on neuroendocrine and behavioral responses during lactation is poorly understood. In our study, we demonstrated that dexamethasone treatment reduced oxytocin and prolactin secretion during lactation and attenuated maternal and aggressive behavior in lactating female rats. These results suggest that the functional significance of these HPA axis responses during lactation is also involved in the adequate neuroendocrine and behavioral responses to suckling.

Acknowledgments

We are grateful for excellent technical support of Marina F. Venâncio and José dos Reis Pereira. We thank Dr. José Antunes-Rodrigues and Dr. Lucila L. K. Elias of Universidade de São Paulo for providing laboratory facilities.

Address all correspondence and requests for reprints to: Alexandre Giusti-Paiva, Ph.D., Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, 37130-000 Alfenas, MG, Brasil. E-mail: agiustipaiva@gmail.com.

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvol-

vimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. Bosch OJ 2011 Maternal nurturing is dependent on her innate anxiety: the behavioral roles of brain oxytocin and vasopressin. *Horm Behav* 59:202–212
2. Numan M, Stolzenberg DS 2009 Medial preoptic area interaction with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. *Front Neuroendocrinol* 30:46–64
3. Bridges RS, DiBiase R, Loundes DD, Doherty PC 1985 Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. *Science* 227:782–784
4. Higuchi T, Honda K, Fukuoka T, Negoro H, Wakabayashi K 1985 Release of oxytocin during suckling and parturition in the rat. *J Endocrinol* 105:339–346
5. Higuchi T, Tadokoro Y, Honda K, Negoro H 1986 Detailed analysis of blood oxytocin levels during suckling and parturition in the rat. *J Endocrinol* 110:251–256
6. Mann PE 2006 Finasteride delays the onset of maternal behavior in primigravid rats. *Physiol Behav* 88:333–338
7. Moos F, Poulain DA, Rodriguez F, Guerne Y, Vincent JD, Richard P 1989 Release of oxytocin within the supraoptic nucleus during the milk ejection reflex in rats. *Exp. Brain Res* 76:593–602
8. Neumann I, Russell JA, Landgraf R 1993 Oxytocin and vasopressin release within the supraoptic and paraventricular nuclei of pregnant, parturient and lactating rats: a microdialysis study. *Neuroscience* 53:65–75
9. Taya K, Sasamoto S 1990 Involvement of the adrenal gland in the suckling-induced decrease in LH and FSH secretion and the concomitant increase in prolactin secretion in the rat. *J Endocrinol* 125:279–285
10. Giovenardi M, Padoin MJ, Cadore LP, Lucion AB 1998 Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. *Physiol Behav* 63:351–359
11. Lee HJ, Macbeth AH, Pagani JH, Young 3rd WS 2009 Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog Neurobiol* 88:127–151
12. Durló FV, Castro M, Elias LL, Antunes-Rodrigues J 2004 Interaction of prolactin, ANPergic, oxytocinergic and adrenal systems in response to extracellular volume expansion in rats. *Exp Physiol* 89:541–548
13. Lauand F, Ruginsk SG, Rodrigues HL, Reis WL, de Castro M, Elias LL, Antunes-Rodrigues J 2007 Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation. *Neuroscience* 147:247–257
14. Ruginsk SG, Oliveira FR, Margatho LO, Vivas L, Elias LL, Antunes-Rodrigues J 2007 Glucocorticoid modulation of neuronal activity and hormone secretion induced by blood volume expansion. *Exp Neurol* 206:192–200
15. Torner L, Toschi N, Nava G, Clapp C, Neumann ID 2002 Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. *Eur J Neurosci* 15:1381–1389
16. Brunton PJ, Russell JA, Douglas AJ 2008 Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. *J Neuroendocrinol* 20:764–776
17. Thoman EB, Levine S 1970 Hormonal and behavioral changes in the rat mother as a function of early experience treatments of the offspring. *Physiol Behav* 12:1417–1421

18. **Hennessy MB, Harney KS, Smotherman WP, Coyle S, Levine S** 1977 Adrenalectomy-induced deficits in maternal retrieval in the rat. *Horm Behav* 9:222–227
19. **Rees SL, Panesar S, Steiner M, Fleming AS** 2004 The effects of adrenalectomy and corticosterone replacement on maternal behavior in the postpartum rat. *Horm Behav* 46:411–419
20. **Grosvenor CE, Mena F** 1983 Effect of underfeeding upon the rate of milk ejection in the lactating rat. *J Endocrinol* 96:215–222
21. **Haanwinckel MA, Elias LK, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J** 1995 Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7902–7906
22. **Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ** 1998 Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5335–5340
23. **Myers MM, Brunelli SA, Squire JM, Shindeldecker RD, Hofer MA** 1989 Maternal behavior of SHR rats and its relationship to offspring blood pressures. *Dev Psychobiol* 22:29–53
24. **Slamberová R, Szilágyi B, Vathy I** 2001 Repeated morphine administration during pregnancy attenuates maternal behavior. *Psychoneuroendocrinology* 26:565–576
25. **De Almeida RM, Lucion AB** 1997 8-OH-DPAT in the median raphe, dorsal periaqueductal gray and corticomedial amygdala nucleus decreases, but the medial septal area it can increase maternal aggressive behavior in rats. *Psychopharmacology* 134:392–400
26. **Consiglio AR, Borsoi A, Pereira GA, Lucion AB** 2005 Effects of oxytocin microinjected into the central amygdaloid nucleus and bad nucleus of stria terminalis on maternal aggressive behavior in rats. *Physiol Behav* 85:354–362
27. **Consiglio AR, Bridges RS** 2009 Circulating prolactin, MPOA prolactin receptor expression and maternal aggression in lactating rats. *Behav Brain Res* 197:97–102
28. **Veiga CP, Miczek KA, Lucion AB, Almeida RM** 2007 Effect of 5-HT_{1B} receptor agonists injected into the prefrontal cortex on maternal aggression in rats. *Braz J Med Biol Res* 40:825–830
29. **Champagne FA, Francis DD, Mar A, Meaney MJ** 2003 Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav* 79:359–371
30. **Grosvenor CE, Shyr SW, Goodman GT, Mena F** 1986 Comparison of plasma profiles of oxytocin and prolactin following suckling in the rat. *Neuroendocrinology* 43:679–685
31. **Taya K, Greenwald GS** 1982 Mechanisms of suppression of ovarian follicular development during lactation in the rat. *Biol Reprod* 27:1090–1101
32. **Taya K, Sasamoto S** 1989 Inhibitory effects of corticotrophin releasing factor and β -endorphin on LH and FSH secretion in the lactating rat. *J Endocrinol* 120:509–515
33. **Gimpl G, Fahrenholz F** 2001 The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81:629–683
34. **Voogt JL, Sar M, Meites J** 1969 Influence of cycling, pregnancy, labor, and suckling on corticosterone-ACTH levels. *Am J Physiol* 216:655–658
35. **Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G** 2000 Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80:1523–1631
36. **Ben-Jonathan N, Hnasko R** 2001 Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22:724–763
37. **Pi XJ, Grattan DR** 1999 Increased expression of both short and long form of prolactin receptor mRNA in hypothalamic nuclei of lactating rats. *J Mol Endocrinol* 23:13–22
38. **Walsh RJ, Slaby FJ, Posner BI** 1987 A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 120:1846–1850
39. **Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE, Lupini CE** 1990 Central prolactin infusion stimulates maternal behavior in steroid-treated nulliparous female rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8003–8007
40. **Melo AI, Pérez-Ledezma M, Clapp C, Arnold E, Rivera JC, Fleming AS** 2009 Effects of prolactin deficiency during the early postnatal period on the development of maternal behavior in female rats: mother's milk makes the difference. *Horm Behav* 56:281–291
41. **Lucas BK, Ormandy CJ, Binart N, Bridges RS, Kelly PA** 1998 Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology* 139:4102–4107
42. **Leng G, Meddle SL, Douglas AJ** 2008 Oxytocin and the maternal brain. *Curr Opin Pharmacol* 8:731–734
43. **Kendrick KM** 2000 Oxytocin, motherhood and bonding. *Exp Physiol* 85:1115–1245
44. **Neumann I, Ludwig M, Engelmann M, Pittman QJ, Landgraf R** 1993 Simultaneous microdialysis in blood and brain: oxytocin and vasopressin release in response to central and peripheral osmotic stimulation and suckling in the rat. *Neuroendocrinology* 58:637–645
45. **Bealer SL, Crowley WR** 1998 Noradrenergic control of central oxytocin release during lactation in rats. *Am J Physiol* 274(3 Part 1):E453–E458
46. **Landgraf R, Neumann ID** 2004 Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front Neuroendocrinol* 25:150–176
47. **Neumann ID** 2007 Stimuli and consequences of dendritic release of oxytocin within the brain. *Biochem Soc Trans* 35:1252–1257
48. **Fahrbach SE, Morrell JI, Pfaff DW** 1985 Possible role for endogenous oxytocin in estrogen-facilitated maternal behavior in rats. *Neuroendocrinology* 40:526–532
49. **van Leengoed E, Kerker E, Swanson HH** 1987 Inhibition of postpartum maternal behaviour in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. *J Endocrinol* 112:275–282
50. **Johns JM, Noonan LR, Zimmerman LI, McMillen BA, Means LW, Walker CH, Lubin DA, Meter KE, Nelson CJ, Pedersen CA, Mason GA, Lauder JM** 1998 Chronic cocaine treatment alters social/aggressive behavior in Sprague-Dawley rat dams and in their prenatally exposed offspring. *Ann NY Acad Sci* 846:399–404
51. **Elliott JC, Lubin DA, Walker CH, Johns JM** 2001 Acute cocaine alters oxytocin levels in the medial preoptic area and amygdala in lactating rat dams: implications for cocaine-induced changes in maternal behavior and maternal aggression. *Neuropeptides* 35:127–134
52. **Lubin DA, Elliott JC, Black MC, Johns JM** 2003 An oxytocin antagonist infused into the central nucleus of the amygdala increases maternal aggressive behavior. *Behav Neurosci* 117:195–201
53. **Insel TR** 1992 Oxytocin—a neuropeptide for affiliation: evidence from behavioral, receptor autoradiographic, and comparative studies. *Psychoneuroendocrinology* 17:3–35
54. **Chozick BS** 1986 The behavioral effects of lesions of the amygdala: a review. *Int J Neurosci* 29:205–221
55. **Kemble ED, Blanchard DC, Blanchard RJ** 1990 Effects of regional amygdaloid lesions on flight and defensive behaviors of wild black rats (*Rattus rattus*). *Physiol Behav* 48:1–5
56. **Gammie SC, Nelson RJ** 2001 cFOS and pCREB activation and maternal aggression in mice. *Brain Res* 898:232–241
57. **Francis DD, Champagne FC, Meaney MJ** 2000 Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *J Neuroendocrinol* 12:1145–1148
58. **Kendrick KM, Keverne EB, Hinton MR, Goode JA** 1992 Oxytocin, amino acid and monoamine release in the region of the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis of the sheep during parturition and suckling. *Brain Res* 569:199–209
59. **Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Dreifuss JJ, Barberis C, Jard S** 1992 Oxytocin receptors in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 652:29–38
60. **Ingram CD, Wakerley JB** 1993 Post-partum increase in oxytocin-

- induced excitation of neurons in the bed nuclei of the stria terminalis in vitro. *Brain Res* 602:325–330
61. **Condés-Lara M, Veinante P, Rabai M, Freund-Mercier MJ** 1994 Correlation between oxytocin neuronal sensitivity and oxytocin-binding sites in the amygdala of the rat: electrophysiological and histoautoradiographic study. *Brain Res* 637:277–286
 62. **Wakerley JB, Terenzi MG, Housham SJ, Jiang QB, Ingram CD** 1998 Electrophysiological effects of oxytocin within the bed nuclei of the stria terminalis: influence of reproductive stage and ovarian steroids. *Prog Brain Res* 119:321–334
 63. **Agrell J, Wolff JO, Ylonen H** 1998 Counter-strategies to infanticide in mammals: costs and consequences. *Oikos* 83:507–517
 64. **Numan M, Insel TR** 2003 *The neurobiology of parental behavior*. New York: Springer Verlag
 65. **Tribollet E, Barberis C, Dreifuss JJ, Jard S** 1988 Autoradiographic localization of vasopressin and oxytocin binding sites in rat kidney. *Kidney Int* 33:959–965
 66. **Yoshimura R, Kiyama H, Kimura T, Araki T, Maeno H, Tanizawa O, Tohyama M** 1993 Localization of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain. *Endocrinology* 133:1239–1246
 67. **Veinante P, Freund-Mercier MJ** 1997 Distribution of oxytocin- and vasopressin-binding sites in the rat extended amygdala: a histoautoradiographic study. *J Comp Neurol* 383:305–325
 68. **Yoshida M, Takayanagi Y, Inoue K, Kimura T, Young LJ, Onaka T, Nishimori K** 2009 Evidence that oxytocin exerts anxiolytic effects via oxytocin receptor expressed in serotonergic neurons in mice. *J Neurosci* 29:2259–2271
 69. **Liberzon I, Chalmers DT, Mansour A, Lopez JF, Watson SJ, Young EA** 1994 Glucocorticoid regulation of hippocampal oxytocin receptor binding. *Brain Res* 650:317–322
 70. **Liberzon I, Young EA** 1997 Effects of stress and glucocorticoids on CNS oxytocin receptor binding. *Psychoneuroendocrinology* 22: 411–422
 71. **Patchev VK, Schlosser SF, Hassan AH, Almeida OF** 1993 Oxytocin binding sites in rat limbic and hypothalamic structures: site-specific modulation by adrenal and gonadal steroids. *Neuroscience* 57:537–543
 72. **Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG** 2003 Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* 23:4850–4857
 73. **Di S, Malcher-Lopes R, Marcheselli VL, Bazan NG, Tasker JG** 2005 Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and γ -aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology* 146:4292–4301
 74. **Evanson NK, Tasker JG, Hill MN, Hillard CJ, Herman JP** 2010 Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. *Endocrinology* 151:4811–4819
 75. **Ruginsk SG, Lopes da Silva A, Ventura RR, Elias LL, Antunes-Rodrigues J** 2009 Central actions of glucocorticoids in the control of body fluid homeostasis: review. *Braz J Med Biol Res* 42:61–67
 76. **Ruginsk SG, Uchoa ET, Elias LL, Antunes-Rodrigues J** 2010 CB(1) modulation of hormone secretion, neuronal activation and mRNA expression following extracellular volume expansion. *Exp Neurol* 224:114–122
 77. **Wingfield JC, Sapolsky RM** 2003 Reproduction and resistance to stress: when and how. *J Neuroendocrinol* 15:711–724
 78. **Bókony V, Lendvai AZ, Liker A, Angelier F, Wingfield JC, Chastel O** 2009 Stress response and the value of reproduction: are birds prudent parents? *Am Nat* 173:589–598
 79. **Shanks N, Windle RJ, Perks P, Wood S, Ingram CD, Lightman SL** 1999 The hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to endotoxin is attenuated during lactation. *J Neuroendocrinol* 11:857–865
 80. **Thoman EB, Conner RL, Levine S** 1970 Lactation suppresses adrenal corticosteroid activity and aggressiveness in rats. *J Comp Physiol Psychol* 70:364–369
 81. **Hard E, Hansen S** 1985 Reduced fearfulness in the lactating rat. *Physiol Behav* 35:641–643
 82. **Ferreira A, Hansen S, Nielsen M, Archer T, Minor BG** 1989 Behavior of mother rats in conflict tests sensitive to antianxiety agents. *Behav Neurosci* 103:193–201
 83. **Neumann ID** 2003 Brain mechanisms underlying emotional alterations in the peripartum period in rats. *Depress Anxiety* 17:111–121

Elsevier Editorial System(tm) for Neuroscience Letters
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Glucocorticoids revert maternal anxiolysis during lactation

Article Type: Research Paper

Keywords: Dexamethasone, maternal anxiolysis, lactating rats, elevated T-maze, open field.

Corresponding Author: Dr Alexandre Giusti-Paiva, PhD

Corresponding Author's Institution: Federal University of Alfenas

First Author: Fabiana C Vilela, PhD

Order of Authors: Fabiana C Vilela, PhD; Carla M Melo; Alexandre Giusti-Paiva, PhD

Abstract: Lactating female rats show a maternal anxiolysis signal, which is part of the behavioral pattern that develops post-partum and seems to be related to hormonal changes during lactation. Assuming that glucocorticoids modulate prolactin and oxytocin secretion, we evaluated the effect of dexamethasone on behavior responses of fear and anxiety in lactating rats. For this study, the non-lactating and lactating rats were submitted to an elevated T-maze and open field tests. In the elevated T-maze, the lactating rats showed a decrease in inhibitory avoidance and an increase in the escape time when compared with the non-lactating group. The lactating rats that had been treated with dexamethasone showed increased initial avoidance latency when compared with lactating rats treated with vehicle. The same result was found in the subsequent repetitions (avoidance 1 and 2). In addition, there was a reduction in one-way escape time for the lactating rats that were treated with dexamethasone. The lactating rats treated with vehicle had the number of central entries, and consequently, the anti-thigmotactic effect increased relative to non-lactating rats. Thus, lactating rats showed a reduced emotional responsiveness as evaluated by elevated T-maze and open field tests, which characterizes maternal anxiolysis. In addition, it could be concluded that the dexamethasone reverts maternal anxiolysis in lactating female rats.

Suggested Reviewers: Lucila Elias
llelias@fmrp.usp.br

Samia Joca
samia@usp.br

Leonardo Resstel
leoresstel@yahoo.com.br

Silvia Ruginsk
sruginsk@rfi.fmrp.usp.br

José Antunes-Rodrigues
jantunesr@gmail.com

Luis C Reis

lcreis@ufrj.br

Celso R Franci
crfranci@fmrp.usp.br

Evelin C Carnio
carnioec@eerp.usp.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas–MG, October 12, 2011.

S.G. Waxman
Editors-in-Chief
Neuroscience Letters

Dear Editor;

We would like to submit the manuscript entitled “*Glucocorticoid revert maternal anxiolysis during lactation*” to be considered for publication in Neuroscience Letters. All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki on the welfare of experimental animals and with the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Alfenas.

The manuscript was edited for language, grammar, punctuation, spelling and overall style by native English speaking editors at American Journal Experts (key: 2F22-A143-CC50-FB71-9374).

No portion of the current manuscript has been published elsewhere, nor is the manuscript currently submitted to another journal for publication. All authors have consented to the submission, and all data have been used with the consent of the individual responsible for generating the data.

Sincerely,

Alexandre Giusti-Paiva, PhD
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade Federal de Alfenas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700
Centro
37130-000
Alfenas, MG
Brasil
Tel: +55 35 32991303
Fax: +55 35 32991063
e-mail: agiustipaiva@gmail.com

*Highlights

- ✓ Lactating rat dams are less anxious when compared with virgin females.
- ✓ The reduced anxiety in lactation can be referred to as maternal anxiolysis.
- ✓ The reduced emotional responsiveness during lactation has related with oxytocin and prolactin
- ✓ Glucocorticoids disrupt neuroendocrine and behavioral responses during lactation.
- ✓ The attenuation of emotional response is impaired by administration of glucocorticoids in lactating rats.

Glucocorticoids revert maternal anxiety during lactation

Fabiana C. Vilela, Carla M. Melo, Alexandre Giusti-Paiva

Laboratory of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of
Alfenas-MG, Brazil.

*** Corresponding author:**

Alexandre Giusti-Paiva, PhD
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade Federal de Alfenas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700
Centro
37130-000
Alfenas, MG
Brasil
Tel: +55 35 32991303
Fax: +55 35 32991063
e-mail: agiustipaiva@gmail.com

Abstract

Lactating female rats show a maternal anxiolysis signal, which is part of the behavioral pattern that develops post-partum and seems to be related to hormonal changes during lactation. Assuming that glucocorticoids modulate prolactin and oxytocin secretion, we evaluated the effect of dexamethasone on behavior responses of fear and anxiety in lactating rats. For this study, the non-lactating and lactating rats were submitted to an elevated T-maze and open field tests. In the elevated T-maze, the lactating rats showed a decrease in inhibitory avoidance and an increase in the escape time when compared with the non-lactating group. The lactating rats that had been treated with dexamethasone showed increased initial avoidance latency when compared with lactating rats treated with vehicle. The same result was found in the subsequent repetitions (avoidance 1 and 2). In addition, there was a reduction in one-way escape time for the lactating rats that were treated with dexamethasone. The lactating rats treated with vehicle had the number of central entries, and consequently, the anti-thigmotactic effect increased relative to non-lactating rats. Thus, lactating rats showed a reduced emotional responsiveness as evaluated by elevated T-maze and open field tests, which characterizes maternal anxiolysis. In addition, it could be concluded that the dexamethasone reverts maternal anxiolysis in lactating female rats.

Keywords: Dexamethasone, maternal anxiolysis, lactating rats, elevated T-maze, open field.

1. Introduction

The time around birth is accompanied by physiological and behavioral changes in the maternal brain, which ensures maternal care. Concomitant with the display of maternal behavior, lactating rat dams are less anxious when compared with virgin females [10, 14]. The reduced anxiety in lactation can be referred to as maternal anxiolysis, which is certainly the result of adaptations in the brain that are necessary to the survival of the offspring.

The reduced emotional responsiveness observed during lactation can be explained, at least in part, by an enhanced activity of the brain's oxytocin and prolactin system, as both have anxiolytic properties in male and female rats, especially peripartum. Previous reports demonstrate that high levels of oxytocin and prolactin dampen emotional responsiveness observed during lactation [1, 20, 25].

Glucocorticoids may reduce prolactin and oxytocin secretion [4]. Glucocorticoids also decrease hypothalamic c-fos expression in response to volume expansion in isotonic and hypertonic conditions, as well as during osmotic, cholinergic or angiotensinergic central stimulation in male rats [9, 17]. In addition, glucocorticoids reduce maternal behavior, reduce aggressive behavior, disrupt suckling-induced systemic oxytocin and prolactin secretion, and reduce milk ejection in lactating rats [22]. Thus, glucocorticoids may interfere with the secretion of hormones related to maternal anxiolysis. However, the influence of glucocorticoids on emotional responsiveness in lactating rats is not well understood. The present study aimed to investigate the effect of the glucocorticoid dexamethasone on maternal anxiolysis in lactating female rats that performed the elevated T-maze and open field tests.

2. Experimental procedures

Animals

Subjects were adult Wistar nulliparous female rats that were approximately 3 months of age and weighed 250-280 g. The lactating female rats were on day 6 of lactation. The animals were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Alfenas and were housed in a temperature-controlled room (22°C) with access to water and food *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki on the welfare of experimental animals and with the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Alfenas (# 244/2009).

Elevated T-maze (ETM)

The ETM had three arms of equal dimensions (50×10 cm). One arm, enclosed by walls 40 cm high, was perpendicular to the two opposed open arms. To avoid falls, the open arms were surrounded by 1 cm high Plexiglas. The whole apparatus was elevated 50 cm above the floor.

Non-lactating and lactating female rats were treated with dexamethasone (1 mg/kg; i.p.) or saline (1 ml/kg; i.p.). Two hours after drug or vehicle administration, the animals were tested in the ETM for inhibitory avoidance measurement. When placed at the end of the enclosed arm, the rat is unable to see the open arms until it pokes its head beyond the walls of the closed arm. Being on the open arm seems to be an aversive experience, since rats have an innate fear of height and openness [8]. Thus, for inhibitory avoidance measurements, each rat was placed at the end of the enclosed arm, and the time taken to withdraw from this arm with all four paws toward the open space was recorded (baseline). This procedure allows the animal to learn inhibitory avoidance if it is repeatedly placed inside the enclosed arm to explore the maze. To this end, the same measurement was repeated in two subsequent trials (avoidance 1 and 2) at 30 s

intervals. Following avoidance training (30 s), non-lactating and lactating female rats were placed at the end of the same open arm to which they were previously exposed, and the time that it took to leave this arm with all four paws was recorded (escape). A cutoff time of 300 s was established for the avoidance and escape latencies. The arena was carefully cleaned with 10% ethanol solution after every test.

Open field

The open-field arena was made of acrylic with a base measuring 100 cm by 80 cm and dimensions of 50 cm (height) x 60 cm (diameter); furthermore, the open-field arena had a white floor that was divided into 12 squares. Immediately after being tested in the ETM, non-lactating and lactating female rats were placed in the open field arena to evaluate their anxiolytic and locomotor activity.

In this test, each female rat was placed in the center of the open field, which was novel to the animal. The number of peripheral (adjacent to the walls) and central (away from the walls) squares that the rat entered with all four paws was recorded for 5 min (Vilela et al., 2009). Female rat behavior was continuously videotaped by a video camera placed over the structure and then encoded using a continuous sampling method. The anti-thigmotactic effect was defined as the proportion of entries into the central part of the open-field arena relative to the total number of entries [16, 23]. The arena was carefully cleaned with 10% ethanol solution after every test.

Statistical Analysis

The data were analyzed using the GraphPad software program version 4.0 and were expressed as the mean \pm S.E.M. Statistically significant differences between groups

were calculated using an analysis of variance (ANOVA), followed by the Newman–Keuls test. The significance level was based on p -values of less than 0.05 ($p < 0.05$).

3. Results

Figure 1 shows the latency for baseline, avoidance 1, avoidance 2, and escape during ETM for non-lactating female rats and lactating female rats when treated with saline or dexamethasone. The lactating rats treated with vehicle showed a decrease in time to baseline, avoidance 1, and avoidance 2 ($p < 0.05$; Fig. 1A), when compared with non-lactating rats. In addition, the lactating female rats treated with dexamethasone showed an increase in time to baseline, avoidance 1, and avoidance 2 ($p < 0.05$; Fig. 1A) when compared with lactating rats that were treated with vehicle. There was no significant difference between non-lactating rats treated with vehicle and non-lactating rats treated with dexamethasone.

With respect to escape latency, lactating rats treated with vehicle showed an increase in escape latency ($p < 0.05$; Fig. 1B) when compared with non-lactating rats. There was no significant difference between non-lactating rats treated with vehicle and those that were treated with dexamethasone; however, the lactating female rats treated with dexamethasone showed decreased escape latency ($p < 0.05$; Fig. 1B) when compared with lactating rats that were treated with vehicle.

Figure 2 shows the number of peripheral entries, central entries, and total entries, as well as the ratio of central entries to total entries, on an open field test for non-lactating female rats and lactating female rats when treated with either saline or dexamethasone. No significant difference between groups was observed in the total number of entries in the open field test (Fig. 2C). This result indicates that dexamethasone does not interfere with the animal's movement. Moreover, we observed

an increase in the number of central entries, and consequently, in the ratio of central to total entries, in lactating rats treated that were with vehicle ($p < 0.001$; Fig. 2B) when compared with non-lactating rats. This difference was diminished in lactating rats that were treated with dexamethasone, relative to the lactating group that was treated with vehicle ($p < 0.001$; Fig. 2B).

4. Discussion

In the present study, dexamethasone altered inhibitory avoidance acquisition in lactating female rats and decreased escape latency in the ETM. In addition, dexamethasone reduced the number of central crossings in the open field test and lessened the anti-thigmotactic effect in lactating female rats. Although the ETM and open field tests are taken as animal models of anxiety, both induce different types of behaviors in animals, and these behaviors are analogous to different psychopathologies. Thus, elevated T-maze is an apparatus that allows the concomitant measurement of responses to both conditioned (inhibitory avoidance) and innate (escape) types of fear [8]. The open field test can be used to evaluate the anti-thigmotactic effect and assess the locomotor activity of animals [16, 23]. The lactating rats treated with vehicle showed reduced emotional responsiveness, as evaluated by the EPM and open field tests, showing the typical behavior of maternal anxiety [6, 7, 10].

The anxiety-like behavior of lactating rats is modulated by pups. Thus, the presence of the litter can induce or potentiate anxiety in open field [7] and conflict tests [6]. The manner by which pups reduce anxiety related responses in these models is unknown, but they likely enhance the motivation of maternal animals to expend energy and overcome adversity to guarantee their own survival. Moreover, these behavioral changes after childbirth appear to depend on hormonal changes, such as increased serum levels of prolactin and oxytocin [2, 10, 14]. Both of these peptides have been

shown to have anxiolytic properties, not only in lactation. It is interesting that in virgin female and male rats, the central administration of oxytocin results in reduced anxiety levels, both on the elevated plus-maze and the light-dark box. The chronic intracerebroventricular (i.c.v.) application of oxytocin via osmotic minipumps has been shown to decrease the anxiety of lactating rats [2]. In addition, the chronic elevation of brain oxytocin in virgin female rats is related to the attenuation of the emotional response to acute noise stress [25]. Furthermore, i.c.v. infusion of a selective oxytocin receptor antagonist increases anxiety [11] while concurrently decreasing maternal care [2] and maternal aggression [1].

Previous studies report that mice with low prolactin levels during early pregnancy exhibit postpartum anxiety and impaired maternal interactions with pups [20, 21]. The i.c.v. infusion of prolactin is anxiolytic in virgin female and male rats [3]; conversely, the infusion of antisense oligonucleotides that target the prolactin receptor was anxiogenic [21]. Additionally, it has been shown that the interaction with pups increases both the expression and release of prolactin mRNA, specifically within the paraventricular nucleus of the hypothalamic (PVN) and preoptic areas [15]. These sites modulate anxiety and are two of likely many brain areas where infant contact increases intracerebral prolactin and reduces anxiety [20].

Our experiments show that the attenuation of emotional response to ETM and open field tests are impaired by a single administration of dexamethasone in lactating rats. In accordance with our results, we suggest that dexamethasone reversed maternal anxiolysis, or exerted an anxiogenic effect (in the open field test and ETM) and panicogenic response (in ETM), exclusively in lactating female rats. Glucocorticoids affect the neuroendocrine response to licking in lactating rats and are capable of disrupting not only oxytocin but also prolactin function [22]. This effect may be

responsible for reversing maternal anxiolysis in lactating rats. In other experiments, dexamethasone has been shown to suppress prolactin [4] and oxytocin secretion [17] induced by blood volume expansion and decrease oxytocin secretion and c-fos expression in magnocellular neurons of PNV and SON in male rats [9]. Other studies suggest that glucocorticoid action on magnocellular neurons seems to be predominantly inhibitory. Some investigators have proposed that glucocorticoids could act on transmembrane G protein-coupled receptors to stimulate the release of endocannabinoids in the hypothalamus [5]. Subsequently, the endocannabinoids could act as retrograde messengers that not only inhibit the release of glutamate but also stimulate the release of gamma-aminobutyric acid (GABA), contributing to the decreased activity of both parvocellular and magnocellular hypothalamic neurons [18].

In both models used in our study, the lactating rats that were treated with dexamethasone showed a similar profile to non-lactating rats. In addition, dexamethasone did not change the behavioral patterns of the non-lactating rats. During the postpartum period, there is an increased incidence of dysfunctional mood disorders [10, 13, 19]. Anxiety is the most common postpartum mood disorder, and it can affect infants' ability to attach to the mothers, inflicting a substantial toll on both the mother and the baby [12, 24]. Attempts to understand the underlying mechanisms of postpartum mood disorders have been impeded by the lack of an appropriate animal model that induces anxiety while retaining the unique hormonal changes that occur during the peripartum period. This study demonstrates that the administration of dexamethasone in lactating rats reverses maternal anxiolysis, inducing a behavioral state consistent with postpartum anxiety.

References

- [1] Bosch, O.J., Meddle, S.L., Beiderbeck, D.I., Douglas, A.J., Neumann, I.D., Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety. *J. Neurosci.* 25 (2005) 6807-6815.
- [2] Bosch, O.J., Neumann, I.D., Brain vasopressin is an important regulator of maternal behavior independent of dams' trait anxiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105 (2008) 17139-17144.
- [3] Donner, N., Bredewold, R., Maloumy, R., Neumann, I.D., Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *Eur. J. Neurosci.* 25 (2007) 1804-1814.
- [4] Durlo, F.V., Castro, M., Elias, L.L., Antunes-Rodrigues, J., Interaction of prolactin, ANPergic, oxytocinergic and adrenal systems in response to extracellular volume expansion in rats. *Exp. Physiol.* 89 (2004) 541-548.
- [5] Evanson, N.K., Tasker, J.G., Hill, M.N., Hillard, C.J., Herman, J.P., Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. *Endocrinology.* 151 (2010) 4811–4819.
- [6] Ferreira, A., Hansen, S., Nielsen, M., Archer, T., Minor, B.G., Behavior of mother rats in conflict tests sensitive to antianxiety agents. *Behav. Neurosci.* 103 (1989) 193–203.
- [7] Fleming, A.S., Luebke, C., Timidity prevents the nulliparous female from being a good mother. *Physiol. Behav.* 27 (1981) 863–868.
- [8] Graeff, F.G., Netto, C.F., Zangrossi Jr, H., The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23 (1998) 237-246.

- [9] Lauand, F., Ruginsk, S.G., Rodrigues, H.L., Reis, W.L., de Castro, M., Elias, L.L., Antunes-Rodrigues, J., Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation. *Neuroscience*. 147 (2007) 247-257.
- [10] Lonstein, J.S., Regulation of anxiety during the postpartum period. *Front. Neuroendocrinol.* 28 (2007) 115-141.
- [11] Manning, M., Kruszynski, M., Bankowski, K., Olma, A., Lammek, B., Cheng, L.L., Klis, W.A., Seto, J., Haldar, J., Sawyer, W.H., Solid-phase synthesis of 16 potent (selective and nonselective) in vivo antagonists of oxytocin. *J. Med. Chem.* 32 (1989) 382-391.
- [12] Matthey, S., Barnett, B., Howie, P., Kavanagh, D.J., Diagnosing postpartum depression in mothers and fathers: whatever happened to anxiety? *J. Affect. Disord.* 74 (2003) 139-147.
- [13] Munk-Olsen, T., Laursen, T.M., Pedersen, C.B., Mors, O., Mortensen, P.B., New parents and mental disorders: a population-based register study. *JAMA*. 296 (2006) 2582-2589.
- [14] Neumann, I.D., Torner, L., Wigger, A., Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. *Neuroscience*. 95 (2000) 567-575.
- [15] Pi, X.J., Grattan, D.R., Increased expression of both short and long form of prolactin receptor mRNA in hypothalamic nuclei of lactating rats. *J. Mol. Endocrinol.* 23 (1999) 13-22.

- [16] Prut, L., Belzung, C., The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463 (2003) 3-33.
- [17] Ruginsk, S.G., Oliveira, F.R., Margatho, L.O., Vivas, L., Elias, L.L., Antunes-Rodrigues, J., Glucocorticoid modulation of neuronal activity and hormone secretion induced by blood volume expansion. *Exp. Neurol.* 206 (2007) 192-200.
- [18] Ruginsk, S.G., Uchoa, E.T., Elias, L.L., Antunes-Rodrigues, J., CB(1) modulation of hormone secretion, neuronal activation and mRNA expression following extracellular volume expansion. *Exp. Neurol.* 224 (2010) 114–122.
- [19] Seyfried, L.S., Marcus, S.M., Postpartum mood disorders. *Int. Rev. Psychiatry.*, 15 (2003) 231-242.
- [20] Slattery, D.A., Neumann, I.D., No stress please! Mechanisms of stress hyporesponsiveness of the maternal brain. *J. Physiol.* 586 (2008) 377-385.
- [21] Torner, L., Toschi, N., Pohlinger, A., Landgraf, R., Neumann, I.D., Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J. Neurosci.* 21 (2001) 3207-3214.
- [22] Vilela, F.C., Giusti-Paiva, A., Glucocorticoids disrupt neuroendocrine and behavioral responses during lactation. *Endocrinology.* (2011) DOI: 10.1210/en.2011-1096
- [23] Vilela, F.C., Soncini, R., Giusti-Paiva, A., Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. *J. Ethnopharmacol.* 124 (2009) 325-327.

[24] Weinberg, M.K., Beeghly, M., Olson, K.L., Tronick, E., Effects of maternal depression and panic disorder on mother-infant interactive behavior in the face-to-face still-face paradigm. *Infant. Ment. Health. J.* 29 (2008) 472-491.

[25] Windle, R.J., Shanks, N., Lightman, S.L., Ingram, C.D., Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. *Endocrinology.* 138 (1997) 2829-2834.

LEGENDS

Figure 1. Effects of the administration of dexamethasone (1 mg/kg, i.p.) or saline (1 mL/kg, i.p.) in non-lactating female rats and lactating female rats on elevated T-maze performance. (A) Latency to baseline, avoidance 1, and avoidance 2 and (B) escape latency were measured. Each column represents the mean (\pm S.E.M.) performance of eight animals. * $p < 0.05$ compared with the non-lactating groups. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ compared with lactating rats that were treated with vehicle.

Figure 2. Effects of the administration of dexamethasone (1 mg/kg, i.p.) or saline (1 mL/kg, i.p.) in non-lactating female rats and lactating female rats on open field test. The graphs depict the number of (A) peripheral entries, (B) central entries and (C) total entries, as well as (D) the ratio central entries to total entries. Each column represents the mean (\pm S.E.M.) performance of eight animals. *** $p < 0.001$ compared with the non-lactating groups. ### $p < 0.001$ compared with lactating rats that were treated with vehicle.

Figure 1:

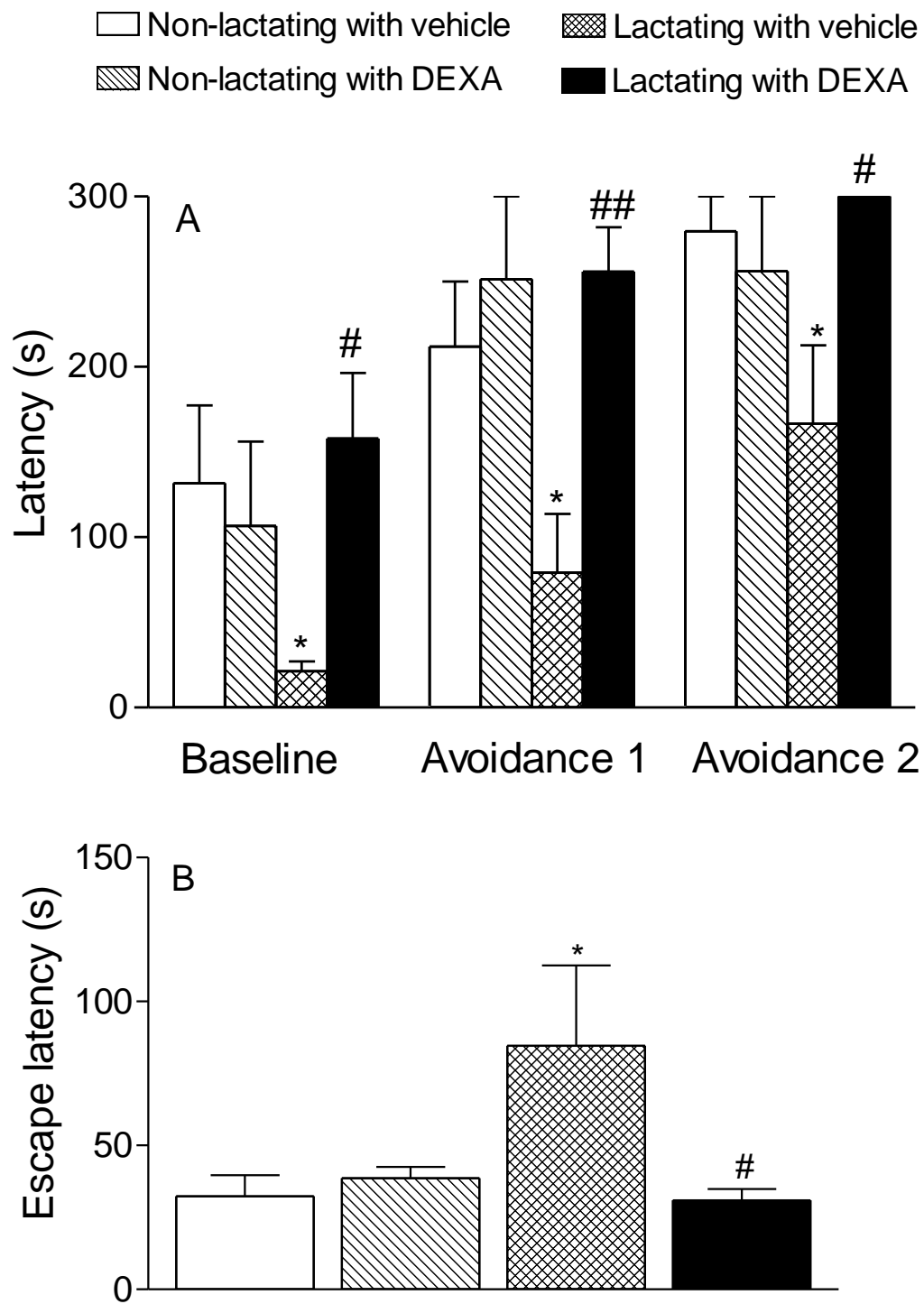


Figure 2:

