



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Indução de hiper-reatividade ao estresse por separação materna em rato da linhagem *Wistar*

Gabriela Camila Barreto¹, Steffanie Nunes Martins Brito¹, Karina Bianca Messias¹, Ricardo Sgarbi Augusto¹ e Otávio Augusto Martins^{1,2}

¹Faculdades Integradas Regionais de Avaré, Fundação Regional Educacional de Avaré, Avaré, São Paulo, Brasil.

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Resumo

Os cuidados maternos na infância são a principal fonte de estímulos para o desenvolvimento, crescimento e proteção de respostas adaptativas a fatores estressantes. A privação da presença materna pode romper com essa proteção no início da vida. Procuramos com o presente estudo descrever o desenvolvimento dos filhotes no período do experimento de separação materna. Os filhotes de ratos foram isolados diariamente dos cuidados da mãe durante três horas. O principal resultado foi que os filhotes que sofreram separação materna apresentaram um desenvolvimento inferior comparados com os filhotes controle. Podemos concluir que o estresse durante a infância pode influenciar o desenvolvimento emocional e provocar fisiopatologias no animal adulto.

Palavras-chave: estresse; separação materna; rato.

Induction of hyper-reactivity to stress by maternal separation in rat of the *Wistar* strain

Abstract

Maternal care in childhood is the main source of stimuli for the development, growth and protection of adaptive responses to stressors. The presence of maternal deprivation can break this protection early in life. We look with this study describing the development of the pups during the experiment of maternal separation. The pups of rats were isolated daily from the mother's care for three hours. The main result was that puppies who suffered maternal separation showed a lower growth compared with control pups. We can conclude that stress during childhood may influence the development and cause emotional pathophysiology in the adult animal.

Keywords: stress, maternal separation; rat.

INTRODUÇÃO

A separação materna (SM) é um modelo que analisa a importância do cuidado parental para o desenvolvimento dos animais. Essa separação afeta muito os recém-nascidos e crianças durante os estágios mais vulneráveis de seu desenvolvimento cerebral, comprometendo o indivíduo, resultando em alterações morfológicas, neuroquímicas, comportamentais e cognitivas (SAMPAIO, 2009).

O desenvolvimento dos mamíferos é bastante caracterizado por um período de dependências materno. A mãe provê estímulos térmicos, sonatossensórios, olfatórios, visuais e auditivos que são essenciais no desenvolvimento pós-natal. O ambiente proporcionado pela mãe para o infante nesse período produz impactos psicológicos e neurobiológicos em animais e seres humanos, influenciando respostas metabólicas durante toda a vida (KREMER *et al.*, 2008).

O rompimento da mãe com o feto altera resultado de relacionamento em longo prazo, e outras mudanças comportamentais e respostas ao estresse (KAWAKAMI *et al.*, 2007). Variações nos cuidados maternos representa um fator importante no desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-adenal (HHA) e no comportamento dos filhotes (MARTINS, 2007).

Segundo Morffett *et al.* (2006) há evidências que alguns eventos adversos como o aumento da separação materna durante o período pós-natal, é associado ao aumento da vulnerabilidade na vida adulta em relação a alguns tipos de drogas e estresses.

Quando o ser humano, adulto ou criança é submetido a um fator, de mudança ou adaptação, o processo de estresse pode ser iniciado, dependendo da magnitude do esforço envolvido no restabelecimento da homeostase interna, devido a necessidade humana de manter o equilíbrio interior (LIPP *et al.*, 2002).

Os eventos traumáticos ou estressantes vivenciados na infância podem ter profundos efeitos comportamentais na vida do adulto. A privação materna na infância associa-se a distúrbios de comportamento em humanos. Estes distúrbios incluem depressão, ansiedade, abuso de drogas, alterando o comportamento e comprometendo a aprendizagem (MOFFETT *et al.*, 2006). O comportamento materno é capaz de modular o desenvolvimento de respostas individuais do eixo HHA, provocando assim, influências em relação às repostas comportamentais ao estresse no adulto (MARTINS, 2007).

O estresse é descrito pela maior parte das pessoas como uma forma de expressar suas emoções, assim como o medo, a raiva, a tristeza e até mesmo as alegrias (GOMES & BOSA, 2004). Alguns destes sentimentos em doses elevadas podem levar ou induzir um indivíduo a um estresse intenso. Também é uma reação do organismo composta por componentes físicos, e/ ou psicológicos, causados pelas alterações psicofisiológicas que ocorrem quando a pessoa se confronta com uma situação que, de um modo ou de outro, a irrite, amedronte, excite ou confunda, ou mesmo que a faça imensamente feliz (LIPP *et al.*, 2002).

O grau de estresse experimentado pelo sujeito também está relacionado as mudanças enfrentadas em um determinado período de tempo, ou seja é a reação do organismo frente a situações extremamente difíceis e excitantes (GOMES & BOSCA, 2004).

O estresse infantil se assemelha ao causado em adulto em vários aspectos, as reações desta doença englobam transformações psicológicas, físicas e químicas no organismo, podendo provir de fontes internas ou externas. As fontes internas estão associadas à maneira pela qual o sujeito reage diante de situações provenientes do cotidiano, enquanto as fontes externas referem-se aos fatores ambientais (LIPP *et al.*, 2002). Cabral (2004) afirma que o consumo de substâncias com ação psicotrópicas como o álcool tem evoluído de acordo como esses tipos de agravos na vida juvenil.

Com base neste estudo, os objetivos do presente trabalho consistiram em (a) descrever a metodologia de indução de hiper-reatividade ao estresse por separação materna (SM) e (b) analisar o desenvolvimento dos filhotes neste período experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Os ratos da linhagem Wistar foram provenientes do Biotério das Faculdades Integradas Regionais de Avaré (FIRA), Fundação Regional Educacional de Avaré (FREA), São Paulo, Brasil.

Foram formados dois casais da linhagem Wistar. As fêmeas adultas, após a fertilização, foram acompanhadas durante o período gestacional. O dia do nascimento foi estipulado o dia zero, quando a ninhada foi padronizada com oito filhotes. Ao longo do experimento, os filhotes foram agrupados em dois tratamentos experimentais (Controle- C e Separação Materna- SM). Os filhotes de cada tratamento receberam ração normal e água potável.

O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Indução de hiper-reatividade ao estresse por Separação Materna (SM)

Os filhotes da ninhada do grupo SM foram separados da mãe diariamente durante o Período Hiporresponsivo ao Estresse (SHRP), do 4º ao 14º dia de idade, sempre no mesmo horário. Durante a separação materna, os filhotes foram individualizados em caixas com oito subdivisões, uma para cada filhote, durante 3 h. Os filhotes foram acomodados em sala anexa, com temperatura de 30°C e a umidade superior a 50%. Após este período de 3 h os filhotes foram devolvidos aos cuidados da mãe, retirando-se a mãe de sua caixa antes de retornar a prole.

Os animais foram manejados por único pesquisador do início ao fim da experimentação. As mãos do investigador foram lavadas, secas e esfregadas na maravalha de forro das caixas da ninhada, eliminando assim todos os odores que levassem a rejeição da mãe à prole. A sala de experimentação foi mantida isolada ao máximo de ruídos externos.

Análise do desenvolvimento da ninhada

Foi mensurada a massa corpórea inicial, massa corpórea final e ganho de massa corpórea absoluta dos filhotes dos tratamentos controle e da indução de hiper-reatividade ao estresse por separação materna no período de 4º a 14º dia de após o nascimento da ninhada.

Análise Estatística

O estudo estatístico das variáveis foi realizado através da ANOVA e complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey para contraste entre médias dos tratamentos. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. As conclusões estatísticas foram realizadas com 5% de significância. Detalhes a respeito da metodologia empregada podem ser encontrados em Banzatto & Kronka (1989).

RESULTADOS

Descrição da Separação Materna (SM)

Os ratos do tratamento passaram por um processo experimental de SM que aconteceu a partir do quarto ao décimo quarto dia após o nascimento. Para manusear os ratos, o manipulador tinha obrigatoriamente que lavar as mãos, colocar luvas e esfregar as mãos na maravalha, que continha as fezes e a urina, antes de realizar o processo de manipulação neonatal com a ninhada (Figuras 1).



Figura 1. As mãos do manipulador esfregadas com as fezes e a urina dos ratos da linhagem *Wistar* antes da Separação Materna (SM).

Primeiro dia de SM: A mãe foi separada da ninhada em outra caixa. Após o procedimento de esfregar as mãos com a maravalha, iniciou-se o procedimento de SM, que se resumia em separar os filhotes da rata mãe. Os filhotes foram colocados individualmente numa caixa com oito divisões (Figuras 2 e 3). Os filhotes ficaram isolados da mãe e dos demais ratos por 3 horas. Após o procedimento, a ninhada era recolocada junto com a rata mãe. O comportamento materno era de pegá-los individualmente com a boca na região dorsal e logo após realizava a limpeza na região urogenital. Quando terminava o processo de limpá-los, ela se arcava com o dorso levantado sobre os filhotes para alimentá-los e protegê-los.



Figura 2. Filhotes de ratos da linhagem Wistar separados da rata mãe em caixa com oito divisões.



Figura 3. Os filhotes separados da mãe durante três horas no experimento Separação Materna.

Segundo dia de SM: foram realizados os mesmos procedimentos que no primeiro dia de experimentação. Foram observados que os filhotes apresentavam pelos visíveis e nítidos pelo corpo. Ao retornar os filhotes à caixa, a rata mãe apresentou o mesmo comportamento descrito no primeiro dia do experimento.

Terceiro dia de SM: foram realizados os mesmos procedimentos de separação da rata mãe da ninhada. Nesse dia foi observado que quase todos os indivíduos da ninhada já apresentavam a orelha parcialmente descolada e que

estavam mais agitados. Ao retornar os filhotes à caixa, a rata mãe apresentou o mesmo comportamento descrito no primeiro dia do experimento. A rata pegou com a boca a região dorsal dos filhotes, lambeu a região urogenital e amamentou com o dorso arcado.

Quarto dia de SM: foram realizados os mesmos procedimentos de separação da rata mãe da ninhada. Foi observado que alguns indivíduos da ninhada já apresentavam dentes. No procedimento de voltar a ninhada com a rata mãe, ela os carregou para o lado contrario da caixa. A rata mãe demorou menos tempo carregando a ninhada e, em seguida, realizou o processo de lambe a região urogenital. Logo em seguida, se arcou com o dorso levantado sobre a ninhada para alimentá-los.

Quinto dia de SM: foram realizados os mesmos procedimentos que no primeiro dia de experimentação. Ao retornar os filhotes à caixa, a rata mãe apresentou o mesmo comportamento descrito no primeiro dia do experimento. A rata mãe demorou menos tempo carregando a ninhada. Neste dia se observou que as orelhas de todos os filhotes apresentavam descoladas.

Sexto dia de SM: foram realizados os mesmos procedimentos de separação da rata mãe da ninhada. Observou-se que alguns filhotes apresentavam os olhos semiabertos e totalmente cobertos de pelos. Ao retornar os filhotes à caixa, a rata mãe carregou-os para o lado contrario da caixa e realizou o processo de lambê-los na região urogenital. A rata mãe demorou menos tempo realizando esse processo que nos outros dias. Depois se arcou com o dorso levantado sobre a ninhada para alimentá-los.

Sétimo e oitavo dias de SM: foram realizados os mesmos procedimentos de separação da rata mãe da ninhada. Observou-se que a ninhada estava com os olhos totalmente abertos. Os filhotes, no experimento de SM, não dormiam mais na caixa com as oito divisões e se mantinham muito agitados todo o

tempo. Ao retornar à caixa, os filhotes andavam muito pela caixa impossibilitando que a rata mãe pudesse carregá-los. Ela conseguia carregar alguns e os lambia. Os mais agitados da ninhada, quando percebiam que alguns filhotes estavam se alimentando, iam para debaixo da mãe. Nesse momento, ela realizou o procedimento de limpeza do restante da ninhada.

Nono e décimo dias de SM: foram realizados os mesmos procedimentos de separação da rata mãe da ninhada. Os filhotes ficavam agitados e apresentavam unhas e dentes. Nesse momento, os filhotes consumiam o alimento sólido (ração). Ao retornar à caixa, os filhotes andavam muito pela caixa impossibilitando que a rata mãe pudesse carregá-los. Ela conseguia carregar alguns e os lambia. Os mais agitados da ninhada, quando percebiam que alguns filhotes estavam se alimentando, iam para debaixo da mãe. Após cinquenta minutos aproximadamente, se observou que a rata mãe deixava a ninhada sozinha e ia deitar no outro lado da caixa.

Análise do desenvolvimento da ninhada durante a SM

A Tabela 1 demonstra a massa corpórea inicial da ninhada controle foi semelhante comparada com a ninhada que sofreu a SM. Entretanto, a massa corpórea final e o ganho de massa corpórea absoluta foram distintos nas ninhadas controle e SM.

A massa corpórea da ninhada de ratos da linhagem *Wistar* que sofreram SM apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) comparada com a ninhada controle no período de 4^o a 14^o dia de após o nascimento (Tabela 2).

Tabela 1. Massa corpórea inicial (MCI), massa corpórea final (MCF) e ganho de massa corpórea absoluta (GMCA) da ninhada padronizada com oito filhotes de ratos da linhagem Wistar controle (C) e de Separação Materna (SM).

Tratamentos	Parâmetros		
	MCI	MCF	GMCA
Controle	162 g/ninhada	282 g/ninhada	120 g/ninhada
Separação Materna	161 g/ninhada	242 g/ninhada	80 g/ninhada

Tabela 2. Média \pm erro padrão de massa corpórea (g) da ninhada padronizada com oito filhotes de ratos da linhagem Wistar controle (C) e de Separação Materna (SM). Análise estatística e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tratamentos	Média \pm erro padrão da massa corpórea da ninhada (g)
Controle	225,0g \pm 17,9 b ¹
Separação Materna	195,5g \pm 12,5 a

¹ Teste de Tukey ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Nesta pesquisa foi utilizado o método de separação materna para observar as reações da mãe e dos filhotes com o isolamento. Este experimento teve como base o estresse provocado nos filhotes durante o período hiporresponsivo ao estresse do quarto ao décimo quarto dia de vida.

Segundo Kremer *et al.* (2008), os cuidados maternos com a ninhada fortalece as respostas adaptativas e os fatores que inibem o estresse nos recém-nascidos,

protegendo os filhotes de posteriores doenças causado pela vulnerabilidade, sofrida nesta etapa da vida.

Ao longo do trabalho observamos que a privação da presença dos pais, principalmente da presença materna, pode romper a proteção estabelecida com o filhote. Isto acarreta o fator estressante durante o início da vida (JAMPANA & KHAN, 2011).

Junior *et al.* (2007) relataram que a exposição simultânea a vários fatores estressantes na infância tem desencadeado fatores de risco biológicos, sobre tudo de forma agregada, na adolescência.

Rapoport *et al.* (2001) enfatizaram que seria essencial para a saúde mental que o bebê e a criança pequena tivessem uma relação calorosa, íntima e contínua com a mãe, e que fosse prazerosa, e satisfatória para ambos.

Rapoport *et al.* (2001) relatam que uma personalidade estável e autoconfiante se construiria a partir da certeza de contar com o apoio e a presença das figuras paternas e maternas. Também relataram que muitas patologias poderiam ser atribuídas à privação do cuidado materno ou descontinuidade na relação da criança com a figura materna durante os primeiros anos de vida.

Martins *et al.* (2007) relataram que a separação materna é um modelo onde os filhotes são separados da mãe em um intervalo superior a uma hora, geralmente com duração de quatro horas durante dez dias no desenvolvimento pós-natal.

Quando os filhotes retornavam à caixa com a mãe, ficavam mais agitados e a mãe por sua vez também sofria alterações em seu comportamento materno, que cada dia mais tornava se menos intenso. Não só os filhotes sofriam com essa separação, mas que também a mãe ficava sujeita a fatores estressantes deste isolamento. Faturi (2009) relatou que o aumento da vulnerabilidade do organismo e a complexidade dos eventos fisiológicos provocados pelo estresse são também responsáveis por uma série de situações traumáticas. Castro *et al.* (2002) afirmaram que o estresse da mãe pode afetar a sua disponibilidade emocional e física, trazendo efeitos negativos para a interação mãe-criança.

Martins *et al.* (2007) relataram que a separação materna induz a hiperatividade do eixo HHA permanente no adulto, aumentando as concentrações séricas de ACTH. O eixo HHA esta normalmente em desenvolvimento durante o período hiporresponsivo ao estresse, que nos ratos estende-se do quarto ao décimo quarto dia após nascidos.

Nos últimos dias do experimento observamos que, ao retornar os filhotes à caixa com a mãe, eles ficavam inquietos impossibilitando a mãe de carregar e cuidar de todos. Ela cuidava de alguns. Quando os outros percebiam que alguns estavam mamando, eles iam para junto da mãe. Após algum tempo ela saia, deixava os filhotes sozinhos e ia para o outro lado da caixa. Este é um dos fatores provocado pela separação causando estresse também na mãe.

Kremer *et al.* (2008) afirmaram em seu experimento que traumas e negligência na infância exercem influência no comportamento emocional e risco para o desenvolvimento de depressões e durante o crescimento, podendo produzir alterações nos mecanismos neurais e induzir anormalidades em regiões encefálicas que implicam em desordens emocionais.

Em nosso trabalho foi observado que alguns indivíduos se desenvolveram mais rápido que os outros. Dentro da caixa, alguns filhotes ficavam separados da mãe e sozinhos, enquanto outros tentavam subir na lateral da caixa, andando pra um lado e pro outro, e não adormeciam. Segundo Biazus & Ramires (2012), durante a adolescência estes indivíduos apresentam um período de continuas e profundas transformações, tanto no nível psíquico quanto no nível físico social.

Sabemos que estes são alguns fatores provocados pela separação da mãe. Traumas na infância podem não somente aumentar o risco dessas desordens emocionais na vida adulta, mas iniciar doenças e alterar a eficácia do desenvolvimento. A compreensão dos conceitos de vulnerabilidade e de fatores de risco é fundamental para a determinação das inúmeras variáveis presentes na etiologia dos comportamentos observados (DELL'AGLIO *et al.*, 2004).

CONCLUSÃO

Podemos concluir que:

I – O presente trabalho descreveu a metodologia de indução de hiper-reatividade ao estresse por separação materna (SM).

II – O desenvolvimento dos filhotes de ratos que sofreram separação materna foi insatisfatório comparado com os filhotes de ratos controle.

III – A presente pesquisa contribui para demonstrar que a separação da mãe nos primeiros anos de vida pode acarretar em algumas psicopatologias na vida adulta.

IV – A presente pesquisa contribui para demonstrar que traumas e negligências sofrida na infância exercem influência no comportamento emocional e afetivo na vida adulta.

AGRADECIMENTOS

Ao Biotério e Laboratório de Química e Bioquímica das Faculdades Integradas Regionais de Avaré - Fundação Regional Educacional de Avaré. Ao Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – *Campus* de Botucatu.

REFERÊNCIAS

BIAZUS, C. B. & RAMIRES, V. R. R. Depressão na adolescência: uma problemática dos vínculos. *Psicologia em Estudo*, Maringá. V. 17, N. 1, P. 83-91, 2012.

CABRAL, L. R. Alcoolismo Juvenil. *Revista Milleniun*. N. 30, ED. 10, P. 30-44, 2004.

CASTRO, E. K, PICCNINI, C. A. Implicações da doença orgânica crônica na infância para as relações familiares: Algumas questões teóricas. *Psicologia: Reflexão e Crítica*. V. 15, N.3, P. 625-635, 2002.

DELL'AGLIO, D. D, SANTOS, S. S, BORGES, J. L. Infração juvenil feminina: Uma trajetória de abandonos. *Internação em Psicologia*. N. 8, V. 2, P. 191-198, 2008.

FATURI, C. B. Consequência da privação materna para o comportamento tipo-ansioso: participação do eixo Hipotálamo-Pituitária- Adrenal e do Sistema de Neurotransmissão, 2009.

GOMES, V. F, BOSA, C. Estresse e relação familiares na perspectiva de irmãos de indivíduos com transtornos globais de desenvolvimento. Estudo de psicologia. V. 3, N. 9, P. 553-561, 2004.

JAMPANA, S. C. & KHAN, R. Pathogenesis of alcoholic hepatitis: Role of inflammatory signaling and oxidative stress. Journal List: World J Hepatol. V. 3, N. 5, May. 27, 2011.

JUNIOR, J. C. F, MENDES, J. K. F, BARBOSA, D. B. M. Associação entre comportamento de risco à saúde em adolescentes. Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano. V. 9, ED.3, P. 250-256, 2007.

KAWAKAMI, S. E, QUADROS, I. M. H, TAKAHASHI, S, SUCHECKI, D. Longa separação materna acelera sensibilização comportamental ao etanol em fêmea, mas não em ratinhos machos (2007).

KREMER, R, MARTINS, O. A, TEIXEIRA, G. R, PINHEIRO, P. F. F, JUNIOR, W. M, MARTINEZ, F. E. Estresse na infância de roedores. PVBVET, Londrina, V. 2, N. 32, ED. 43, ART. 52, 2008. Disponível em: http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=52. Acesso em: 12/08/2012.

LIPP, M. E. N, ARANTES, J. P, BURITI, M. S, WITIZIG, T. O Estresse em escolares. Psicologia escolar e educacional, V. 6, N. 1, P. 51-56, 2002.

MARTINS, O. A, TEIXEIRA, G. R, PINHEIRO, P. F. F, MARTINEZ, F. E, JUNIOR, W. M. Separação materna: um modelo de estresse neonatal para o rato Wistar. PVBVET, Londrina, V. 2, N.26, ED. 37, ART. 50, 2008. Disponível em: http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=50. Acesso em: 12/08/2012.

MOFFETT, M. C., VICENTIC, A., KOZEL, M., PLOTSKY, P., FRANCIS, D. D, KUCHAR, M. J. Separação materna altera os padrões de consumo de drogas na vida adulta em ratos, 2006.

RAPOPORT, A, PICCININI, C. A. O ingresso e adaptação de bebês e crianças pequenas à creche: Alguns aspectos críticos. Psicologia: Reflexão e Crítica. V.14, ED. 1, P.81-95, 2001.

SAMPAIO, V. F. Efeitos da distribuição proteica precoce, e da estimulação ambiental sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais em ratos, 2009.