

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**INFLUÊNCIA DO MANUSEIO NEONATAL SOBRE A  
PREFERÊNCIA DE RATOS JOVENS POR DROGAS  
PSICOESTIMULANTES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Caren Tatiane de David Antoniazzi**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**INFLUÊNCIA DO MANUSEIO NEONATAL SOBRE A  
PREFERÊNCIA DE RATOS JOVENS POR DROGAS  
PSICOESTIMULANTES**

**Caren Tatiane de David Antoniazzi**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilise Escobar Bürger**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**INFLUÊNCIA DO MANUSEIO NEONATAL SOBRE A PREFERÊNCIA  
DE RATOS JOVENS POR DROGAS PSICOESTIMULANTES**

elaborada por  
**Caren Tatiane de David Antoniazzi**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**Comissão Examinadora**

**Marilise Escobar Bürger, Dra.**  
(Presidente/Orientadora)

**Maribel Antonello Rubin, Dra. (UFSM)**

**Nilda Berenice de Vargas Barbosa, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, 02 de julho de 2012.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup>. Marilise Escobar Bürger, que aceitou o desafio de receber em seu laboratório cheio de farmacêuticos, uma fisioterapeuta, sem experiência na área de pesquisa e com ideias de projeto totalmente diferentes. Muito obrigada pelos ensinamentos, dedicação e amizade, por abrir as portas da pesquisa para mim e por ter acreditado que hoje chegaríamos até aqui.

Aos meus pais, José Carlos e Ildara, que nos últimos 2 anos não tiveram uma filha em casa, e sim uma visita; e à minha irmã Ana, que cansaram de me ouvir dizer: “Não posso! Estou fazendo minhas coisas do mestrado!”. Obrigada por tudo. Eu amo vocês.

Aos colegas, mas acima de tudo, amigos do laboratório FARMATOX, que contribuem de forma essencial para a construção do meu conhecimento e foram indispensáveis na realização desse trabalho. Obrigada por toda a ajuda e também por sempre incentivarem o exercício da minha profissão, a final vocês estão sempre querendo uma “massagem”!!!

A todos os amigos e familiares, que contribuem com sua amizade, carinho e incentivo, que tiveram a paciência de me ouvir falando sobre ratos, projetos, aulas e que receberam centenas de promessas de visitas que nunca foram cumpridas, obrigada pela paciência!

À professora Dr<sup>a</sup> Analú Lopes Rodrigues pela amizade, pelas conversas, por estar sempre disposta a ajudar e por ter me proporcionado a oportunidade de conhecer as técnicas de manuseio neonatal, ainda na época da minha graduação.

Às agências de fomento que financiaram direta ou indiretamente esta pesquisa: CNPQ, FAPERGS, PROAP-UFSM, e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

E enfim, à Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e seus professores, pela possibilidade de realização deste curso.

*Muitas das circunstâncias da vida são criadas por três escolhas básicas: as disciplinas que você decide manter, as pessoas com quem você decide estar e as leis que você decide obedecer.*

*(Charles Millhuff)*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **INFLUÊNCIA DO MANUSEIO NEONATAL SOBRE A PREFERÊNCIA DE RATOS JOVENS POR DROGAS PSICOESTIMULANTES**

AUTORA: CAREN TATIANE DE DAVID ANTONIAZZI

ORIENTADORA: MARILISE ESCOBAR BÜRGER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 02 de julho de 2012.

O uso abusivo de drogas psicoestimulantes é um problema social comum em países de diferentes culturas, cuja incidência tem tomado dimensões crescentes e alarmantes. Experimentalmente, alguns estudos tem mostrado a influência da exposição precoce ao estresse sobre alterações nos padrões de abuso, a qual pode cumprir um importante papel sobre a vulnerabilidade para o uso excessivo de drogas psicoestimulantes na idade adulta. Por outro lado, procedimentos como estimulação tátil (ET) neonatal e o isolamento neonatal (IN), têm sido descritos por interferir em parâmetros comportamentais e neurofisiológicos, que podem persistir durante a vida adulta. Assim, este estudo objetivou investigar a preferência condicionada de lugar (PCL) a drogas psicoestimulantes e sobre sintomas de ansiedade relacionados à abstinência, em ratos jovens expostos à ET e ao IN. No 1º experimento, filhotes machos de ratos Wistar foram submetidos diariamente à ET ou IN<sub>10</sub>, por 10 minutos, ou a IN<sub>60</sub>, por 1 hora, desde o dia pós-natal 1 (DPN1) até o DPN21. Os animais não manuseados (NM) permaneceram no ninho sem qualquer tipo de manipulação. No DPN40, os animais foram submetidos ao protocolo de PCL, induzido por cocaína (20mg/Kg, i.p.), durante 10 dias. No DPN52, os animais foram testados quanto à preferência e no DPN55 foram avaliados sintomas de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Os grupos ET e IN<sub>10</sub> não apresentaram PCL, entretanto NM e IN<sub>60</sub> preferiram o compartimento associado à droga. Em relação aos sintomas de ansiedade observados durante a abstinência da droga, os grupos ET e IN<sub>10</sub>, apresentaram maior tempo de permanência nos braços abertos do LCE, mostrando menor grau de ansiedade. Na sequência do estudo, um 2º experimento foi conduzido, a fim de verificar a influência da ET e do IN sobre a PCL induzida por anfetamina (ANF), seguindo o mesmo protocolo de manuseio descrito no experimento anterior até o DPN40, quando os animais foram submetidos ao protocolo de PCL associado à administração de ANF (4mg/Kg, i.p.), durante 8 dias. No DPN50, após avaliação comportamental, observou-se que o grupo IN apresentou preferência pelo compartimento associado à ANF e no DPN53, durante abstinência da droga, o grupo ET apresentou menor preferência ao compartimento associado à droga. A atividade exploratória em campo aberto foi maior para o grupo ET no DPN50, enquanto o grupo IN apresentou sintomas de ansiedade no DPN53. De forma semelhante, animais expostos à ET mostraram menor grau de ansiedade em diversos parâmetros avaliados no LCE e no teste da escada, onde a atividade exploratória também foi maior do que para outros manuseios. Tomados em conjunto, estes estudos mostraram pela primeira vez que os efeitos benéficos da ET, podem modificar o comportamento frente à PCL, bem como influenciar os sintomas de ansiedade relacionados à abstinência de cocaína e ANF. A continuidade dos estudos relacionados aos benefícios da ET sobre vias de recompensa, sistemas de neurotransmissores e vias de sinalização celular, deverá ser realizada em um futuro breve.

Palavras-chave: Estimulação tátil neonatal. Manuseio neonatal. Preferência condicionada de lugar. Cocaína. Anfetamina.

## **ABSTRACT**

Master Dissertation  
Graduate Program in Pharmacology  
Federal University of Santa Maria

### **INFLUENCE OF NEONATAL HANDLING ON THE PREFERENCE OF YOUNG RATS FOR PSYCHOSTIMULANT DRUGS**

AUTHOR: CAREN TATIANE DE DAVID ANTONIAZZI

ADVISOR: MARILISE ESCOBAR BÜRGER

Date and place of defense: July 2<sup>nd</sup>, 2012, Santa Maria.

The abusive use of psychostimulant drugs is a common social problem in countries of different cultures, whose incidence is increasing and alarming dimensions taken. Experimentally, some studies have shown the influence of early exposure to stress on changes in patterns of abuse, which may play an important role on the vulnerability to excessive use of psychostimulant drugs in adulthood. On the other hand, procedures such as neonatal tactile stimulation (TS) and neonatal isolation (NI), has been described by interfering with behavioral and neurophysiological parameters, which may persist into adulthood. This study aimed to investigate the conditioned place preference (CPP) and the psychostimulant drugs on anxiety-like symptoms related to abstinence in young rats exposed to TS and NI. In the first experiment, male pups of Wistar rats were subjected daily to TS or NI<sub>10</sub> for 10 minutes, or NI<sub>60</sub> for 1 hour, from postnatal day 1 (PND1) to PND21. The unhandled (UH) animals remained in the nest without any manipulation. At PND41, animals were subjected to CPP protocol induced by cocaine (20mg/kg, i.p.), for 10 days. At PND53, animals were tested for preference, and at PND55 symptoms of anxiety were evaluated on the elevated plus-maze task (EPM). TS and NI<sub>10</sub> groups did not show preference on CPP, however UH and NI<sub>60</sub> preferred the chamber associated with drug. In relation to anxiety-like symptoms observed during drug withdrawal, TS and NI<sub>10</sub> groups presented higher time spent in the open arms of EPM, showing less anxiety-like behavior. Following the first study, a 2<sup>nd</sup> experiment was conducted to verify the influence of TS and NI on the CPP induced by amphetamine (AMPH), following the same neonatal handling protocol described in the previous experiment until the PND40, when animals were submitted to a CPP paradigm associated with administration of AMPH (4mg/kg, i.p.) for 8 days. At PND50, following behavioral assessment was observed that NI group had preference for the compartment associated with AMPH, and at PND53 during withdrawal of drug, TS group showed lower preference to compartment associated with drug. The exploratory activity in open field was higher in TS group at PND50, while NI group showed anxiety-like symptoms at PND53. Similarly, animals exposed to TS showed lesser degree of anxiety-like behavior in many different parameters evaluated at EPM and at staircase test, where the exploratory activity also was higher than other handlings. Taken together, these studies showed for the first time that beneficial effects of TS can modify the behavior on CPP paradigm, and influence the anxiety-like symptoms related to withdrawal from cocaine and AMPH. Continuity of studies related to the benefits of TS on reward pathways, neurotransmitter systems and signaling pathways, should be completed in the near future.

Keywords: Neonatal tactile stimulation. Neonatal handling. Conditioned place preference. Cocaine. Amphetamine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### MANUSCRITO 1

- FIGURE 1 – Effects of neonatal handling on time spent in the cocaine-associated compartment in CPP during post-conditioning test in young rats .....35
- FIGURE 2 – Effects of neonatal handling on EPM during abstinence of cocaine in young rats. Anxiety-like symptoms were evaluated by time in open (A) and closed (B) arms.....36

### RESULTADOS PARA MANUSCRITO 2

- FIGURA 1 – Efeito do manuseio neonatal sobre a preferência condicionada de lugar, induzida por anfetamina.....45
- FIGURA 2 – Efeitos do manuseio neonatal sobre o comportamento de ratos jovens em campo aberto, 24 (2A, 2B e 2C) e 96 (2D, 2E e 2F) horas após a última administração de anfetamina/salina.....46
- FIGURA 3 – Efeitos do manuseio neonatal sobre a atividade de ratos jovens no labirinto em cruz elevado, 96h após a última administração de anfetamina/salina.....47
- FIGURA 4 – Efeitos do manuseio neonatal sobre a atividade de ratos jovens no teste da escada, 96h após a última administração de anfetamina/ salina.....48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico  
ANF – anfetamina  
ANOVA – análise de variância  
BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro  
DA – dopamina  
EO – estresse oxidativo  
EROS – espécies reativas de oxigênio  
ET – estimulação tátil  
HPA – eixo hipófise-pituitária-adrenal  
IN – isolamento neonatal  
MAO – monoamina oxidase  
NE – norepinefrina  
PCL – preferência condicionada de lugar  
RL – radicais livres  
SM – separação materna  
SNC – sistema nervoso central  
THDA – transtorno da hiperatividade e déficit de atenção

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
<b>3 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS</b> .....	20
<b>3.1 MANUSCRITO 1 – TACTILE STIMULATION AND NEONATAL ISOLATION     CHANGES BEHAVIORAL EFFECTS OF COCAINE IN YOUNG     RATS: A PILOT STUDY</b> .....	21
Abstract.....	23
Introduction.....	24
Material and methods.....	26
Results and Discussion.....	27
Acknowledgements.....	30
References .....	30
<b>3.2 MANUSCRITO 2 – INFLUENCE OF NEONATAL TACTILE STIMULATION ON     CONDITIONED PLACE PREFERENCE AND ANXIETY-LIKE     SYMPTOMS IN YOUNG RATS TREATED WITH AMPHETAMINE     (em fase de redação)</b> .....	37
Materiais e métodos.....	38
Animais.....	38
Protocolo experimental.....	38
Preferência condicionada de lugar.....	39
Teste em campo aberto.....	41
Labirinto em cruz elevado.....	42
Teste da escada.....	42
Análise estatística.....	43
Resultados.....	43
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	51
<b>6 PERSPECTIVAS</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53

## **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação apresenta parte dos métodos e resultados embutidos em um manuscrito que se encontra na secção **MANUSCRITOS CIENTÍFICOS**, sob a formatação da revista para a qual foi submetido para publicação. Outra parte dos resultados encontra-se na secção Manuscrito 2 – Em fase de redação, que farão parte do conteúdo do 2º Manuscrito, completando assim a íntegra deste estudo.

Ao fim desta dissertação encontra-se o item **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, nos quais há interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito científico e os resultados parciais contidos neste estudo.

As **REFERÊNCIAS** referem-se às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **Manuscrito 2 – Em fase de redação**, **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** desta dissertação.

# 1 INTRODUÇÃO

Durante o período neonatal, o sistema nervoso central (SNC) é imaturo e por isso suscetível às intervenções ambientais (KOEHL et al., 2002; LEVINE, 1957; SANCHEZ, LADD e PLOTSKY, 2001) e dessa forma, os eventos que interferem no ambiente do neonato durante esse período, podem levar a alterações importantes na formação do SNC (FENOGLIO, BRUNSON e BARAM, 2006). Neste mesmo estágio, as respostas adaptativas ao estresse podem ser modificadas conforme os eventos a que os neonatos estão expostos (MEANEY et al., 1993). Experiências traumáticas e exposição a ambientes adversos em períodos precoces da infância (CHAMPAGNE, de KLOET e JOELS, 2009; KNUTH e ETGEN, 2007) podem induzir alterações comportamentais e neuroendócrinas na idade adulta, tanto em humanos quanto em animais (CHAMPAGNE, de KLOET e JOELS, 2009; PLOTSKY et al., 2005).

Nos humanos, as experiências estressantes nessa fase do desenvolvimento estão associadas ao elevado risco para distúrbios psicossociais agudos e crônicos na idade adulta, tais como distúrbios afetivos e abuso de drogas (ANAND e SCALZO, 2000; HEIM e NEMEROFF, 2001). Em animais, as experiências vividas precocemente no ninho também são críticas para o desenvolvimento e causam alterações nos sistemas fisiológico, neuroendócrino, comportamental, emocional, social e cognitivo, que irão formar a base para as respostas aos estímulos e comportamento na idade adulta (FLEMING, O'DAY e KRAEMER, 1999; LEHMANN e FELDON, 2000; LEVINE et al., 1967).

Em ratos recém-nascidos, o estresse promove morte neuronal (ZHANG et al., 2002) e torna-os mais vulneráveis à preferência por cocaína (GORDON, 2002; SINHA et al., 2000, 2003). O estresse gestacional e neonatal também afeta a neurogênese e diminui a produção de novos neurônios na idade adulta (LEMAIRE et al., 2000). A neurogênese parece ter um papel importante na cognição, emoção e memória relacionada às drogas (ABROUS, KOEHL e Le MOAL, 2005; McEWEN, 2003). Por isso, sugere-se que sua desregulação esteja envolvida na deterioração cognitiva, nos distúrbios de humor e na adição (ABROUS, KOEHL e Le MOAL, 2005).

A dependência de drogas é um fenômeno com causas e consequências fisiológicas, psicológicas e sociais (NESTLER e AGHAJANIAN, 1997), que pode ser conceituada como uma síndrome em que o abuso da droga passa a ter prioridade sobre outros comportamentos considerados importantes para o indivíduo antes da sua experiência com as drogas. Em sua

forma extrema, a dependência está associada ao uso compulsivo da droga (EDWARDS, ARIF e HADGSON, 1981). Considera-se como estimulante toda substância utilizada voluntariamente com a finalidade de obtenção de estados alterados de consciência, caracterizados por estado de euforia, decorrente da estimulação do SNC. No Brasil, fármacos proscritos como a cocaína e os compostos anfetamínicos, são utilizados com esta finalidade (CHASIN e SILVA, 2003).

A cocaína, um alcalóide ativo naturalmente encontrado e extraído do arbusto da coca (*Erythroxylum coca*), é amplamente consumida de modo abusivo pelos humanos (JOHANSON e SCHUSTER, 1995). Classifica-se como um agente dopaminérgico de ação indireta, por ligar-se ao transportador pré-sináptico da dopamina (DA), bloqueando a sua captação para dentro do terminal pré-sináptico (O'BRIEN, 2006), e permitindo assim o acúmulo da DA na fenda sináptica. A DA livre e em concentrações aumentadas é capaz de interagir com receptores dopaminérgicos, iniciando uma sequência de eventos que modificam a atividade neuronal momentaneamente (NICOLA, SURMEIER e MALENKA, 2000). A cocaína também pode atuar reduzindo a recaptação de outras monoaminas tais como norepinefrina e serotonina, além do glutamato, os quais estão envolvidos direta ou indiretamente nos efeitos da cocaína, sendo que o conjunto de alterações momentâneas e duradouras altera a expressão do comportamento (NICOLA, SURMEIER e MALENKA, 2000; O'DONNELL, 2003).

Desta forma, os efeitos da cocaína sobre o SNC podem ser resumidos pelo desenvolvimento de sintomas como euforia, autoconfiança, aumento de atenção, redução do apetite, ansiedade, paranoia, comportamento egocêntrico, disforia, anorexia e ilusões (NNADI et al., 2005). Já os sintomas periféricos resumem-se ao aumento da atividade simpaticomimética, observada através de midríase, elevação da pressão arterial, taquicardia, arritmias e até parada cardiorrespiratória, dependendo da dose e via de administração da cocaína. Ainda, a cocaína apresenta potente propriedade anestésica local, cujo uso clínico humano foi pioneiro, servindo de modelo para a síntese dos atuais e modernos anestésicos locais (CRITS-CHRISTOPH et al., 2008).

Conforme Ahlskog (2007), elevadas concentrações de DA no SNC podem estar envolvidas em processos neurodegenerativos, acreditando-se ainda que a metabolização do neurotransmissor seja responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), cuja toxicidade relaciona-se ao desenvolvimento de estresse oxidativo (CHIUEH et al., 1993; FORNSTEDT, 1990) e apoptose.

Neste sentido, os radicais livres (RL) estão envolvidos no desenvolvimento de inúmeras patologias (FANTONE e WARD, 1982; SUNDSTRÖM, SVEDBERG e

CARLING, 1984) e a sua produção excessiva é conhecida como estresse oxidativo (EO). O EO decorre do desequilíbrio entre mecanismos de defesa antioxidantes e a formação de EROS (DAVIES, 1995). Assim, a propriedade pró-oxidante da cocaína decorre de sua atividade sobre os transportadores de monoaminas, que por sua vez elevam os níveis de DA livre, a qual fica vulnerável à auto-oxidação, cujos metabólitos conhecidos são as dopaminoquinonas, precursores de RL (BOESS et al., 2000; DEVI e CHAN, 1996).

Além da cocaína, as anfetaminas são drogas psicoestimulantes sintéticas, com propriedades simpaticomiméticas (substâncias que imitam os efeitos da epinefrina e norepinefrina; ALLES, 1933; ALLES e PRINZMETAL, 1933), que em conjunto com seus derivados, constituem o grupo mais comum de fármacos psicoestimulantes causadores de euforia (BERMAN et al., 2009). Seu efeito está relacionado principalmente ao aumento da liberação de DA, norepinefrina (NE) e 5-hidroxitriptamina (serotonina) na fenda sináptica, apresentando certo predomínio sobre a NE, quando comparado às outras monoaminas (BERMAN et al., 2009; MADRAS, MILLER e FISCHMAN, 2005; ROTHMAN et al., 2001). Além disso, as anfetaminas também agem através da inibição da atividade da monoamina oxidase (MAO), que é uma enzima neuronal responsável pelo catabolismo das catecolaminas, e que apresenta papel fundamental no equilíbrio da atividade dos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico periférico e central (ROTHMAN et al., 2001).

Sintetizada em 1887, mas com propriedades psicoestimulantes identificadas somente na década de 30, a anfetamina (ANF) foi então introduzida na terapêutica como descongestionante nasal e no tratamento clínico da narcolepsia (JULIEN, 1997; PRINZMETAL e BLOOMBERG, 1935), um subtipo de epilepsia caracterizada pelo sono excessivo. Posteriormente, foi utilizada para o tratamento da esquizofrenia, dependência por morfina, hipotensão arterial, enjoos e soluços intensos (JULIEN, 1997). A partir de 1936, a mistura racêmica da ANF (mistura equivalente de dextro e levo anfetamina) passou a ser utilizada para reduzir o apetite de indivíduos obesos, no tratamento do déficit de atenção e na doença de Parkinson (SEIDEN e SABOL, 1993). Seu potencial de abuso foi reconhecido durante a Segunda Guerra Mundial, quando soldados do Eixo (Alemanha, Japão e Itália) e das forças aliadas (Estados Unidos, Reino Unido e União Soviética, entre outros países europeus e de outros continentes) utilizavam anfetaminas para aumentar a vigília, a coragem, e diminuir a fadiga, a fome e os estados de depressão, tornando-se uma droga difundida entre a sociedade no pós-guerra (CALDWELL, CALDWELL e DARLINGTON, 2003; DRUMMER e ODELL, 2001; HERNANDEZ e FERNANDEZ, 1998).

No Brasil, os últimos relatórios (*Escritório contra Drogas e Crimes das Nações Unidas – UNODC, 2008; International Narcotic Control Board – INCB, 2006*) que mencionam a situação do país, alertam para o aumento progressivo do consumo de anfetaminas nas últimas décadas, contrariamente à tendência mundial de retração. Em parte, este aumento pode ser explicado pelo apelo social à utilização desses fármacos para o controle da obesidade, que também são utilizadas com a finalidade de apurar os reflexos e reduzir o cansaço, além de aumentar momentaneamente a velocidade de aprendizagem.

Dessa maneira, além de atletas, muitos estudantes, médicos, motoristas de caminhão e pilotos também fazem uso dessas substâncias (CENTRE FOR ADDICTION AND MENTAL HEALTH, 2004). Os principais objetivos dos usuários são manter o estado de alerta por maior período de tempo e aumentar a capacidade de atenção, concentração e raciocínio (YONAMINE, 2004), sem considerar os efeitos indesejáveis da droga, como elevação da pressão arterial, da temperatura corporal, da frequência cardíaca e respiratória, e que em longo prazo, o uso dessas substâncias pode causar perda excessiva de peso, ansiedade, insônia, alterações de humor, além de distúrbios psicóticos, caracterizados por paranoias e alucinações (MATSUMOTO et al., 2002).

Atualmente, o uso de anfetaminas é proibido em muitos países, sendo que em alguns países europeus, também sua produção e comércio são proibidos, tornando a droga absolutamente clandestina. No Brasil, até o final de 2011, anfetamínicos inibidores do apetite eram clinicamente prescritos e dispensados em farmácias comerciais com exigência de receita médica, sendo destinados ao controle da obesidade e ao tratamento do transtorno da hiperatividade e déficit de atenção (THDA), basicamente. A partir de 9 de dezembro de 2011, os inibidores do apetite anfetamínicos femproporex, mazindol e anfepramona tiveram seu registro cancelado e sua produção, comércio e uso proibidos no Brasil, a partir de uma resolução determinada pela Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Permanece autorizada somente a prescrição de sibutramina como um inibidor do apetite, e metilfenidato e metanfetamina, para tratar o THDA (ANVISA - RDC 52/2011).

A exposição repetida à ANF tem sido experimentalmente empregada como um modelo animal de alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas por psicoestimulantes em ratos (CAMP, DeJONGHE e ROBINSON, 1997; FREY et al., 2006; KAUER-SANT'ANNA et al., 2007). Tal exposição causa sensibilização comportamental, hiperlocomoção e alterações na memória dos animais (PELEG-RAIBSTEIN et al., 2009), além de levar a alterações neuroquímicas e estruturais, incluindo uma elevação de DA, NE e da densidade das espinhas dendríticas em diferentes regiões cerebrais (BISAGNO,

FERGUSON e LUINE, 2003; CAMP, DeJONGHE e ROBINSON, 1997; KALIVAS e STEWART, 1991; ROBINSON e KOLB, 2004).

Os efeitos de recompensa de diversas drogas de abuso têm sido avaliados através da preferência condicionada de lugar (PCL) (BARDO, ROWLETT e HARRIS, 1995; HOFFMAN, 1989), um modelo experimental utilizado para promover um condicionamento através de pistas. Este paradigma é baseado na habilidade do animal em encontrar pistas associadas com a droga para descobrir o local de preferência, e que tem importantes implicações na busca de drogas e recaídas em humanos (HAND, STINUS e LE MOAL, 1989; NEISEWANDER, PIERCE e BARDO, 1990).

A PCL é um modelo animal utilizado para avaliar os efeitos hedônicos das drogas de abuso, que envolve o pareamento repetido de um compartimento com um estímulo específico (droga), enquanto o compartimento oposto é pareado com um estímulo neutro. No dia do teste, que ocorre após o condicionamento e na ausência dos estímulos, é permitido ao animal acesso livre aos compartimentos. Um maior tempo de permanência no compartimento pareado anteriormente com a droga indica a preferência do animal pela droga, enquanto o menor tempo indica aversão (TZSCHENTKE, 1998; 2007).

Diversos estudos com roedores demonstraram que procedimentos estressantes em idade precoce promovem alteração nos padrões de abuso (HEIM e NEMEROFF, 2001; MOFFETT et al., 2007), que irão variar de acordo com a intensidade dos eventos e a idade em que ocorrerem (LEHMANN e FELDON, 2000), cumprindo assim papel significativo no desenvolvimento da vulnerabilidade ao uso excessivo de álcool e de drogas psicoestimulantes na idade adulta (FELITTI et al., 1998; SCHENK et al., 1987). Em humanos, tais estudos comprovam que os eventos adversos na infância, não só influenciam a dependência às drogas, como também aumentam a vulnerabilidade para recaídas durante períodos de abstinência, além de favorecer a manutenção do uso compulsivo de drogas (COFFEY et al., 2002; SINHA, 2001).

Dessa forma, modelos animais de estresse neonatal, como a separação materna (SM), vêm sendo desenvolvidos para explicar estas alterações neuroquímicas e comportamentais resultantes da exposição precoce a fatores estressantes (FRANCIS et al., 1999; LADD et al., 2000).

A SM consiste em afastar os filhotes da mãe por um período que pode variar de alguns minutos até várias horas por dia, durante os primeiros dias logo após o nascimento. Longos períodos de separação materna, também chamados de isolamento neonatal – IN (IMANAKA et al., 2008), podem alterar as vias de resposta ao estresse, pois a mãe é a primeira ligação entre o filhote e o meio ambiente (FRANCIS e MEANEY, 1999) e a interferência nesta relação pode alterar a diferenciação no sistema nervoso dos filhotes (FRANCIS et al., 1996).

De acordo com Imanaka et al. (2008), o IN e a SM podem diferir no que diz respeito ao isolamento individual da ninhada já que muitos procedimentos de SM costumam retirar as mães do ninho por um breve período de tempo, enquanto os filhotes permanecem agrupados na caixa-moradia. Já no IN, obrigatoriamente os filhotes são colocados em caixas individuais menores, ficando assim isolados da mãe e da sua ninhada, por períodos de tempo mais prolongados. As ligações sociais que se formam no período pós-natal ativam sistemas neurais que fazem com que a mãe focalize o bem-estar do recém-nascido, para garantir sua saúde e sobrevivência, sendo que as alterações nesta relação, como por exemplo, o isolamento neonatal, pode induzir um comportamento parental perturbado, como abuso ou negligência (SWAIN et al., 2007).

Esta ruptura na interação entre mãe e filhote produz alterações duradouras no comportamento e na neurofisiologia da prole (HALL, 1998; KUHN e SCHANBERG, 1998), que em geral apresenta depressão, estresse psicológico crônico, dificuldade de lidar com situações estressantes na idade adulta, alterações no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), aumento nos quadros de ansiedade, comportamento reprodutivo alterado, comprometimento do aprendizado e resposta locomotora reduzida (CHAMPAGNE et al., 2003; HUOT et al., 2001, 2002; KALINICHEV et al., 2002).

Ainda, de acordo com Kuhn e Schanberg (1998), a SM prolongada durante os primeiros dias de vida interrompe a maturação da resposta adrenal ao estresse, altera a expressão dos níveis de cortisol, e afeta negativamente a aprendizagem dos animais adultos, a potenciação de longa duração e a organização sináptica hipocampal (MEANEY et al., 1996). Além disso, estudos mostram que os ratos que sofreram separação maternal periódica quando filhotes respondem mais intensamente a um estímulo estressante quando adultos e apresentam uma maior sensibilidade às drogas psicoativas (PLOTSKY e MEANEY, 1993).

A privação do contato materno também diminui a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo dos ratos neonatos, e em contraste, os níveis do fator de crescimento neural aumentam (CIRULLI et al., 1998). Na ausência da mãe, em resposta até mesmo ao estresse leve, os ratos neonatos apresentam secreção aumentada de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de corticosterona (LEVINE et al., 1991; VAN OERS et al., 1998). Sugere-se que estas alterações ocorram em razão da separação materna afetar importantes sistemas de neurotransmissores cerebrais, como os receptores cerebrais de serotonina, a expressão do transportador mesolímbico de dopamina e o desenvolvimento dos receptores GABA<sub>A</sub> e dos benzodiazepínicos centrais (BRAKE et al., 2004; MEANEY, BRAKE e GRATTON, 2002; VICENTIC et al., 2006).

Estudos demonstraram ainda que o estresse neonatal repetitivo pode produzir uma disfunção no sistema opióide endógeno, que pode ser ativado por diferentes tipos de estressores, e sugere-se que esteja envolvido em padrões de recompensa cerebral no abuso de drogas em animais. Juntamente com o sistema dopaminérgico, o sistema opióide endógeno parece influenciar a resposta ao etanol e aumentar a vulnerabilidade para iniciar o consumo excessivo de álcool na idade adulta (PLOJ et al., 2000; PLOJ, ROMAN e NYLANDER, 2003a, 2003b).

Em razão de todas as alterações geradas pelo estresse neonatal ocasionado pela SM prolongada, a estimulação tátil (ET) neonatal vem se destacando como uma forma eficiente de tratamento, capaz de recuperar os déficits neonatais em ratos e reverter e prevenir certos efeitos comportamentais e fisiológicos provenientes da separação materna (BURTON et al., 2007; CHATTERJEE et al., 2007; LEVINE e OTIS, 1958; LÉVY et al., 2003).

A ET neonatal consiste em uma variedade de estímulos sensoriais externos realizados durante as primeiras semanas de vida que efetivamente aceleram a maturação dos neurônios corticais, influenciam o desenvolvimento do SNC, que irão causar alterações em uma grande variedade de processos comportamentais e fisiológicos, entre eles a resposta ao estresse, persistentes na idade adulta (CASOLINI et al., 1997; PHAM et al., 1999; SILVEIRA et al., 2005).

Sugere-se que os efeitos da ET podem ser explicados pelo fato de que as vias neurais da pele para o SNC amadurecem mais cedo do que outros sistemas sensoriais (MONTAGU, 1953). A manipulação neonatal consiste em pelo menos três estímulos diferentes: 1) breve SM, que elimina pistas olfativas bem como a ET provida pela mãe, para ser recuperada posteriormente quando mãe e filhote forem recolocados juntos (PRYCE, BETTSCHEN e FELDON, 2001; VILLESAS et al., 1977); 2) ET realizada por um experimentador, durante o período de separação, que pode em certo grau imitar a estimulação proporcionada pela mãe; e 3) exposição à novidade, que consiste na oferta de novos estímulos ao filhote (LEVINE, 1957).

A estimulação neonatal ainda aumenta a neurogênese pós-natal, previne a perda neuronal no hipocampo associada ao estresse e envelhecimento e melhora a função cognitiva (PHAM et al., 1997; SAPOLSKY, 1992). Este estímulo também se mostrou efetivo na modulação da resposta neuroendócrina ao estresse em animais adultos, melhorando a capacidade de lidar com eventos estressantes em estágios mais avançados do desenvolvimento (CHAMPAGNE, de KLOET e JOELS, 2009; PLOTSKY et al., 2005).

Este modelo de manuseio também foi capaz de reverter os efeitos da SM nos comportamentos de ansiedade (VAN OERS et al., 1998) e sensibilidade à dor (STEPHAN et al., 2002) além de induzir resistência do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal ao estresse em ratos

adultos. Também já demonstrou melhorar o aprendizado e o desempenho dos animais em testes cognitivos e reforçar tanto a memória espacial quanto não-espacial em ratos adultos (KOSTEN, LEE e KIM, 2007; STAMATAKIS et al., 2008). Ainda, foi capaz de facilitar a recuperação após eventos de hipóxia-isquemia neonatal (RODRIGUES et al., 2004) e lesão neonatal no córtex pré-frontal ou córtex parietal posterior (GIBB et al., 2010), sendo que tal recuperação foi correlacionada com a sinaptogênese das células piramidais no córtex intacto adjacente às lesões (GIBB et al., 2010).

Diversos estudos sugerem que a estimulação neonatal altera o comportamento materno e a interação mãe-filhote, o que leva a diferenças no número de lambidas da mãe (LIU et al., 1997) e faz com que as mães de filhotes estimulados permaneçam mais tempo com eles, do que as mães de filhotes que não foram estimulados (CHOU et al., 2001). É este aumento das lambidas maternas durante os primeiros 10 dias de vida do filhote que geram redução nos níveis do ACTH e corticosterona em resposta ao estresse agudo, e aumentam a densidade dos receptores para glicocorticóides no hipocampo e diminuem os níveis do hormônio liberador de corticotrofina (LIU et al., 1997).

A ET neonatal é um paradigma utilizado experimentalmente em animais para testar os efeitos de estímulos externos na vida do recém-nascido em uma variedade de comportamentos e sistemas neuroendócrinos (GOMES, et al., 2005; PADOIN et al., 2001; RAINEKI et al., 2009; TODESCHIN et al., 2009; WINKELLMANN-DUARTE et al., 2007 ), e é muito similar à terapia através da massagem, utilizada em humanos (FIELD, 1998), pois a estimulação tátil neonatal também apresenta diversos efeitos positivos, tanto em aspectos comportamentais como morfológicos (CHOU et al., 2001; FERNÁNDEZ-TERUEL et al., 1992), bem como a terapia através da massagem.

Considerando-se que o IN é um modelo animal de estresse precoce relacionado a alterações neuroquímicas e comportamentais, que pode facilitar a preferência por drogas psicoestimulantes na idade adulta e que a ET tem sido descrita por ter efeitos benéficos sobre a neurogênese e sobre uma menor emotividade dos animais ao lidar com situações traumáticas em estágios mais avançados do desenvolvimento, a realização deste estudo torna-se relevante, pois irá determinar se a qualidade das relações interpessoais vividas na infância, pode de alguma forma alterar o desenvolvimento neuropsicomotor, influenciar padrões comportamentais que poderão determinar a vulnerabilidade ao abuso de drogas psicoativas na adolescência e idade adulta.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência do manuseio neonatal em ratos jovens expostos ao uso condicionado de drogas psicoestimulantes.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos da estimulação tátil e do isolamento neonatal sobre parâmetros de dependência em ratos jovens expostos à cocaína e à anfetamina;
- Avaliar os efeitos da estimulação tátil e do isolamento neonatal sobre graus de ansiedade e sobre atividade motora e exploratória em ratos jovens previamente expostos à cocaína e à anfetamina.

### **3 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS**

Os resultados inseridos nesta dissertação apresentam-se sob a forma de manuscritos científicos, os quais se encontram aqui estruturados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos. O 1º manuscrito foi submetido para publicação na revista *Neurotoxicity Research* e encontra-se sob revisão. O 2º manuscrito encontra-se em fase de redação, sendo aqui apresentados alguns resultados parciais.

Manuscrito 1

**3.1 Tactile stimulation and neonatal isolation changes behavioral effects of cocaine in young rats: A pilot study**

Caren T. D. Antoniazzi, Nardeli Boufleur, Camila S. Pase, Dalila M. Benvegnú, Fábio T. Kuhn, Verônica T. Dias, Hecson J. Segat, Katiane Roversi, Karine Roversi, Marilise E. Bürger

**Tactile stimulation and neonatal isolation changes behavioral effects of cocaine in young rats: A pilot study**

Caren T. D. Antoniazzi<sup>a</sup>, Nardeli Boufleur<sup>a</sup>, Camila S. Pase<sup>b</sup>, Dalila M. Benvegnú<sup>a</sup>, Fábio T. Kuhn<sup>a</sup>, Verônica T. Dias<sup>b</sup>, Hecson J. Segat<sup>b</sup>, Katiane Roversi<sup>b</sup>, Karine Roversi<sup>b</sup>, Marilise E. Bürger<sup>ab\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

\*Corresponding author:

Prof. Dr. Marilise Escobar Bürger

Departamento de Fisiologia e Farmacologia-CCS

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia-CCS

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica-CCNE

Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, BRAZIL

Phone/FAX:+055-55 3220 8676

E-mail: [mariliseeb@yahoo.com.br](mailto:mariliseeb@yahoo.com.br)

**Abstract**

In this study we investigated the influence of neonatal handling on cocaine-induced conditioned place preference (CPP) as well as anxiety-like symptoms related to drug abstinence in young rats. Pups were submitted daily to tactile stimulation (TS) or neonatal isolation for 10 min (NI<sub>10</sub>) and for 1 hour (NI<sub>60</sub>), from postnatal day one (PND1) to PND21. At PND22 pups were weaned and conditioned place preference was performed with cocaine (20 mg/kg ip) at PND40 for 10 days and then evaluated in CPP. TS and NI<sub>10</sub> groups did not show place preference, while unhandled (UH) and NI<sub>60</sub> rats did. Handling was related to anxiety-like symptoms per se, as observed in UH and NI<sub>60</sub> groups by shorter time spent in open arms of elevated plus maze (EPM), and this behavior was also observed in the cocaine-conditioned rats exposed to the same neonatal handlings. While both TS and NI<sub>10</sub> pups treated or not with cocaine spent increased time in open arms of EPM, only TS group stayed shorter in closed arms after cocaine conditioning, showing less anxiety than animals submitted to other neonatal handlings. As a whole, this pilot study indicates that neonatal handling, especially TS, can modify anxiety-symptoms related to cocaine abstinence and preference through molecular mechanisms that shall be investigated in the near future.

**Keywords:** tactile stimulation, conditioned place preference, anxiety-like behavior, cocaine

## 1. Introduction

Cocaine is a psychostimulant drug commonly related to abuse, and its mechanism of action involves inhibition of neuronal monoamines re-uptake, especially dopamine (DA) (Hadfield and Nugent 1983; Izenwasser 2004; Kuhar et al. 1991). Repeated use of cocaine is related to compulsion, despite adverse consequences, and a high prevalence of relapse following its withdrawal (A.P. Association 1994).

Cocaine rewarding effects have been evaluated through conditioned place preference (CPP) (Bardo et al. 1995; Hoffman 1989), an experimental model used for cues-elicited conditioning. This paradigm is based in the ability to find cues associated with drug to elicit place preference, which has important implications for drug “craving” and relapses in humans (Hand et al. 1989; Neisewander et al. 1990).

Human studies have shown a relationship between vulnerability to drug abuse and adverse life effects and/or stress exposure (Sinha 2001; Dube et al. 2003). Early life experiences exert long-lasting effects on behavior and stress reactivity (Padoin et al. 2001; Kabbaj et al. 2002) and may increase propensity to use drugs such as cocaine (Schenk et al. 1987), especially during adolescence (Spear 2000; Casey et al. 2008; Izenwasser 2005, for review). Because of the severity of this problem, CPP and others animal models have been used to study many of the psychobiological and social factors of the transition from infancy into adulthood, which in animal models is defined as the developmental period after weaning and before adulthood (Laviola et al. 2003).

Adolescent rats present different neurochemical responsiveness to stress as compared to adults (Kellogg et al. 1998) and much greater behavioral effects following psychostimulant consumption than infant rats (Cirulli and Laviola 2000). Animal models of early life stress have been developed to elucidate the consequent neurochemical and behavioral changes resulting from stressors, including maternal separation (MS) and neonatal isolation (NI). Animals exposed to early life environmental manipulations display increased sensitivity to stressors and altered hormonal stress responses throughout adult life (Plotsky and Meaney 1993): while pups submitted to brief periods of MS showed fewer anxiety symptoms (McIntosh et al. 1999). Longer periods of MS and/or neonatal isolation (NI) were related to interruption of the dam-pup interaction, which affects the development of the central nervous system (CNS) and can lead to enhanced susceptibility to stress in adulthood (Kalinichev et al. 2002; Knuth and Etgen 2007; Kosten et al. 2004; Kehoe et al. 1998).

Fundamentally, in NI protocol, pups are separated individually from the dam, whereas in MS, the litter as a whole is separated from dam, whose intensity of neonatal stress is directly dependent on separation time. In fact, prolonged separation from the dam during the neonatal period is considered one of the most powerful stressor to which rat pups can be exposed (Rosenfeld et al. 1992; Wigger and Neumann 1999). These neonatal handlings were related to disruption of the adrenal response maturation to stress (Kuhn and Schanberg 1998) as well as to behavioral and neurophysiological changes (Pryce and Feldon 2003; Hall 1998), showing the importance of early life social relationships on neurobiological systems. Of particular importance, neonatal stress is able to affect brain neurotransmitter systems such as dopamine and serotonin (Brake et al. 2004; Meaney et al. 2002; Vicentic et al. 2006) and to promote dysfunctions in endogenous opioid system, suggesting its involvement in brain reward patterns in drug abuse in animals.

Contrarily to stress caused by prolonged MS and/or NI, tactile stimulation (TS) has been related to accelerated maturation of cortical neurons with favorable consequences to behavioral and physiological changes that persist into adulthood (Casolini et al. 1997; Pham et al. 1999; Silveira et al. 2005). Neonatal TS consists of external sensory stimuli that exerts influence on neural pathways from the skin to the CNS associated to accelerated maturation of cortical pyramidal neurons (Schapiro and Vukovich 1970), whose connections are matured earlier than other sensory systems (Montagu 1953). Its experimental application has been linked to increased neurogenesis, prevention of hippocampal neuronal loss induced by stress or aging (Lemaire et al. 2006), suggesting its effectiveness to influence brain functions. Of particular importance, neonatal TS was related to prevention of neural stress markers alteration induced by maternal deprivation (van Oers et al. 1998), demonstrating also less emotionality in stressful situations (Levine and Otis 1958). In fact, neonatal TS is used in animals to test the effects of external stimuli on the newborn's life in a variety of behaviors and neuroendocrine systems (Gomes et al. 2005; Padoin et al. 2001; Rainecki et al. 2009; Todeschin et al. 2009; Winkellmann-Duarte et al. 2007) and is very similar to therapy through massage, used in humans (Field 1998).

Considering that NI is an animal model of early life stress related to neurochemical and behavioral changes, which may facilitate preference for drugs such as cocaine (Kosten et al. 2004; Marquardt et al. 2004), and that TS has been related to beneficial effects on neurogenesis and less emotionality in coping response to traumatic situations, the present study was designed to evaluate the possible influence of these neonatal handlings on cocaine preference behavioral responses, as well on stress, anxiety and fear symptoms as evaluated in

the classical CPP paradigm and elevated plus maze (EPM), respectively. So far no study about effects of TS on drug preference during adolescence has been reported.

## 2. Material and methods

Fifteen pregnant female *Wistar* rats from the breeding facility of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil, were kept in plexiglas cages with free access to food and water in a room with controlled temperature (22–23°C) and on a 12 h-light/dark cycle with lights on at 7:00 a.m. The birth day (postnatal day 0- PND0) was monitored and litters were culled to 8 pups (5 males and 3 females) to ensure adequate nutritional status. At postnatal day one (PND1) male pups of each litter were weighed and randomly assigned to one of four experimental groups (n=14): unhandled (UH), 10 min of tactile stimulation (TS), 10 min of neonatal isolation (NI<sub>10</sub>) (which was considered a time control of TS) and 60 min of neonatal isolation (NI<sub>60</sub>), remaining together with their mothers until weaning. At PND22, litters were weaned and weighed; male pups from the same condition (only one per litter for each handling procedure) were housed by group of three ( $\pm 1$ ) and left undisturbed up to 40 days of age. All procedures were in accordance with the rules of the Committee on Care and Use of Experimental Animals of the UFSM, which follows international rules (NIH Publication No. 80-23; revised 1978). TS, NI<sub>10</sub> and NI<sub>60</sub> were applied daily from PND1 to PND21, between 8:00 and 10:00 a.m. TS consisted in gently stimulating the dorsal surface of the pups with the index finger in rostral caudal direction for 10 min out of the nest (Rodrigues et al. 2004), and NI<sub>10</sub> consisted in removing the pups from the nest and keeping them warm (32° C) in individual plastic boxes lined with soft paper for 10 min. For NI<sub>60</sub>, pups were submitted to the same procedures for 60 minutes, The UH group remained in their nest without any touch by human hand.

Conditioned place preference (CPP) is an animal model used to evaluate hedonic effects of addictive drugs. It involves repeated pairing in a compartment with a specific stimulus (drug), while pairing in the opposite compartment occurs with a neutral stimulus. On the test day (after the conditioning and in the absence of the stimuli), the animal is allowed free access to both compartments. Longer time spent in the drug-paired compartment indicates a preference for drug whereas shorter time spent in it indicates aversion (Tzschentke 1998; 2007).

At 40 days of age (PND40), animals were placed for 15 min in each compartment (either with black walls/white floor or with white walls/grid floor) of a box for habituation. At the next day (PND41), the time spent by the animals in each compartment was monitored for 15 min, which was considered the preconditioning test. The conditioning of place preference

(PND42-51) was performed by daily injection of cocaine (Merck, Germany) (20 mg/Kg- ip; n=7) for 10 days in the non preferred compartment, which was paired with saline administration on alternate turns in the opposite compartment (Martin and Itzhak 2000). Control group (n=7) was injected with saline in both non preferred and opposite compartments, alternatively. After each drug injection, the animals were immediately placed and maintained inside the compartment for 30 min. At PND52 all animals were submitted to 15 min post-conditioning test, which was performed similarly to the preconditioning test.

Two days after this test, anxiety-like symptoms were observed in EPM, which is based on the innate fear rodents have for open and elevated spaces (Montgomery 1955). The apparatus consisted of a plus-shaped platform elevated 50 cm from the floor. Two opposite arms (50 cm×10 cm) were enclosed by 40 cm high walls whereas the other two arms had no walls. The four arms had at their intersection a central platform (10 cm×13.5 cm), which gave access to any of the four arms. Time spent in the open and closed arms was monitored for 5 min, indicating a lesser or higher anxiety grade, respectively (Hlavacova et al. 2010). The apparatus was cleaned with a 20% alcohol solution using wet sponge and paper towel before the introduction of each animal. Observers were blind to treatment during all behavioral observations. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Duncan's Post Hoc tests when appropriate. (Software package Statistica 8.0 for Windows was used). Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant for all comparisons made.

### **3. Results and Discussion**

Different studies have reported that traumatic events during early developmental periods are factors that may lead to psychopathologies (Sanchez et al. 2001; Heim et al. 2004), such as anxiety-like symptoms and stress, depression, and susceptibility to addiction (Koehl et al. 2002; Vallee et al. 1997). Lemaire et al. (2006) showed that tactile stimulation reversed the deleterious effect of prenatal stress on hippocampal neurogenesis. Early life experiences as well as neonatal interventions are able to exert effects on stress reactivity (Kabbaj et al. 2002), whose consequences at neurobiological levels have been shown to cause changes in brain morphology, in DA reward system (Weinstock 2001), and in vulnerability to abuse of drugs such as cocaine (Schenk et al. 1987; Kosten et al. 2000).

In the present study, the different neonatal handlings did not cause any place preference in saline-injected rats, while UH and NI<sub>60</sub> cocaine-treated groups spent higher time in the drug-paired compartment, and this behavior was not observed in TS and NI<sub>10</sub> animals (Figure 1).

Other studies showed an increased cocaine seeking behavior (Lynch et al 2005) as well as its self-administration (Kosten et al. 2000) after NI (NI<sub>60</sub>), but this last behavior was reduced by lower time of isolation (Matthews et al. 1999) as in NI<sub>10</sub>. Furthermore, different authors have shown the influence of NI on stress development and its connection with drugs preference susceptibility (Kosten et al., 2000; Lynch et al., 2005), but here we are showing for the first time the effects of neonatal TS on prevention of cocaine preference development in rats. In fact, in the neonatal period, neurogenesis seems to play a fundamental role on emotional stability in adulthood, and may exert influence on mood disorders and addiction (Abrous et al. 2005).

Up to now, we do not know the exact mechanisms involved in the beneficial effects of TS on the behavioral parameters of drug preference investigated here, but we hypothesized that this handling was able to increase neonatal neurogenesis. Moreover, studies by Kolb and Gibb (*apud* Kolb and Gibb, 2010) reported that neonatal TS increased acetylcholinesterase levels and astrocytic density in cortex of animals. TS also showed effectiveness in growth of premature infants (Field et al. 1986) as well as in newborn rats (Schanberg and Field 1987), lending support to the potential influence of such handling during the neonatal period. A recent study showed the effects of TS on recovery from cortical injury in newborn rats, whose synaptic plasticity was increased by handling (Kolb and Gibb 2010). So far, no study about the influence of TS on psychostimulant drug preference has been reported, and its effects on neuroplasticity and neurogenesis merits further investigation.

Neonatal handling also was able to modify behaviors related to anxiety-like symptoms assessed through EPM. Duncan's test showed that both TS and NI<sub>10</sub> increased time spent in open arms of EPM when compared to other neonatal handlings (UH and NI<sub>60</sub> groups) of saline- and cocaine- treated rats, which were similar to each other (Figure 2A). On the other hand, rats submitted to NI<sub>60</sub> and treated with saline showed higher time spent in EPM closed arms, while other handling procedures presented similar values to each other (Fig. 2B). Between cocaine-treated animals, TS and NI<sub>10</sub> groups showed decreased time spent in the closed arms in relation to UH and NI<sub>60</sub> groups (Fig. 2B). Different studies have shown that neonatal handling in rats can permanently alter different patterns of drug use and behavior (Ader and Grota 1969; Denenberg 1964; Levine 1957; Meaney et al. 1988; Pryce et al. 2001a; Pryce et al. 2001b). In this sense NI<sub>10</sub> is an early perinatal procedure that involves a brief separation of pups from their dam and litter, and was related to neurochemical and behavioral changes in the pups, while deprivation of maternal contact also decreases the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and increases nerve growth factor levels in hippocampus of rats (Cirulli et al. 1998).

In human studies, stress and anxiety-symptoms have been closely related to vulnerability to cocaine abuse, suggesting that these factors can be also predictive to drug use vulnerability (Sinha et al. 2003). In our findings, stress and anxiety-like symptoms, as observed by the total number of entries in arms, was not changed by neonatal handling (data not shown), indicating that differences of time spent in open and/or closed arms are not an artifact from lower locomotor activity but a result of modified emotionality elicited by neonatal handling. These preliminary but promising results suggest that behavioral psychopathologies, particularly stress, anxiety-like symptoms and psychostimulant drugs preference, could be prevented or attenuated by neonatal handling, especially tactile stimulation, which appears to activate neurogenesis in this developmental period. In contrast, NI-induced stress has been linked to persistent neurochemical changes, which affect some behaviors including cocaine self-administration (Mathews et al. 1999; Kosten et al. 2004; Zhang et al. 2005).

Our study showed the influence of neonatal handling, especially TS, on anxiety-like symptoms and preference for cocaine abuse, which may be related to stress and adrenal-pituitary axis stimulation. TS showed greater benefits than the NI<sub>10</sub> did which were opposite to those observed in animals submitted to NI<sub>60</sub>. In fact, while TS consists of an additional stimulus by the experimenter, in NI<sub>10</sub> pups remain separate for 10 min, which is also considered an incentive because they receive more licking and grooming from their dams than UH and NI<sub>60</sub> animals do (Liu et al. 1997; Rodrigues et al. 2004). This last handling is related to disturbance of the dam-pup contact leading to enhanced susceptibility to stress in adulthood (Knuth and Etgen 2007; Kosten et al. 2004). As TS presents an additional stimulus compared to NI<sub>10</sub>, we believe that this may be the main responsible for their more favorable results observed here. This pilot study is critical for an exchange of ideas between different laboratories, and other studies in this line of research should be conducted.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to CNPq, CAPES, FAPERGS and PRPGP (PROAP) for the fellowships and financial support.

### **Declaration of interest**

The authors report no conflicts of interest

## References

- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85:523-569.
- Ader R, Grotta L (1969) Effects of early experience on adrenocortical reactivity. *Physiol Behav* 4:303-5.
- AP Association (1994) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV). American Psychiatric Press, Washington, DC.
- Bardo MT, Rowlett JK, Harris MJ (1995) Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 19:39-51.
- Brake WG et al (2004) Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioral responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur J Neurosci* 19:1863-1874.
- Casey BJ, Jones RM, Hare TA (2008) The adolescent brain. *Ann NY Acad Sci* 1124:111-26.
- Casolini P et al (1997) Effect of increased maternal corticosterone during lactation on hippocampal corticosteroid receptors, stress response and learning offspring in the early stages of life. *Neuroscience* 79:1005-1012.
- Cirulli A et al (1998) Early maternal separation increases NGF expression in the developing rat hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 59:853-858.
- Cirulli F, Laviola G (2000) Paradoxical effects of D-amphetamine in infant and adolescent mice: role of gender and environmental risk factors. *Neurosci Biobehav Rev* 24:73-84.
- Denenberg VH (1964) Stimulus input, and emotional reactivity: a theory of infantile stimulation. *Psychol Rev* 71:335-51.
- Dube SR, Felitti VJ, Dong M, Chapman DP, Giles WH, Anda RF (2003) Childhood abuse, neglect and household dysfunction and the risk of illicit drug use: the adverse childhood experiences study. *Pediatrics* 111:564-572.
- Field T (1998) Massage therapy effects. *American Psychologist* 53:1270-1281.
- Field T, Schanberg SM, Scafidi F, Bauer CR, Vega-Lahr N, Garcia R, Nystrom J, Kuhn CM (1986) Tactile/kinesthetic stimulation effects on preterm neonates. *Pediatrics* 77:654-8.
- Gomes CM et al (2005) Neonatal handling and productive function in female rats. *J Endocrinol* 184:435-445.
- Hadfield MG, Nugent EA (1983) Cocaine: comparative effect on dopamine uptake in extrapyramidal and limbic systems. *Biochem Pharmacol* 32:744-6.
- Hall FS (1998) Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Crit Rev Neurobiol* 12:129-69.

Hand TH, Stinus L, Le Moal M (1989) Differential mechanisms in the acquisition and expression of heroin-induced place preference. *Psychopharmacology* 98:61-7.

Hein C, Plotsky PM, Nemeroff CB (2004) Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. *Neuropsychopharmacology* 29:641-648.

Hlavacova N, Bakos J, Jezova D (2010) Eplerenone, a selective mineralocorticoid receptor blocker, exerts anxiolytic effects accompanied by changes in stress hormone release *J Psychopharmacol* 24:779-86.

Hoffman, DC (1989) The use of place conditioning in studying the neuropharmacology of drug reinforcement. *Brain Res Bull* 23: 373-87.

Izenwasser S (2004) The role of the dopamine transporter in cocaine abuse. *Neurotox Res* 6:379-384.

Izenwasser S (2005) Differential effects of psychoactive drugs in adolescents and adults. *Crit Rev Neurobiol* 17:51-68.

Kabbaj M, Isgor C, Watson SJ, Akil H (2002) Stress during adolescence alters behavioral sensitization to amphetamine. *Neuroscience* 113:395-400.

Kalinichev M, Easterling KW, Plotsky PM, Holtzman SG (2002) Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:131-40.

Kehoe P, Shoemaker WJ, Arons C, Triano L, Suresh G (1998) Repeated isolation stress in the neonatal rat: relation to brain dopamine systems in the 10-day-old rat. *Behav Neurosci* 112:1466-74.

Kellogg CK, Awatramani GB, Piekut DT (1998) Adolescent development alters stressor-induced fos immunoreactivity in rat brain. *Neuroscience*. 83:681-689.

Knuth ED, Etgen AM (2007) Long-term behavioral consequences of brief, repeated neonatal isolation. *Brain Res* 1128:139-47.

Koehl M et al (2002) Individual vulnerability to substance abuse and affective disorders: role of early environmental influences. *Neurotoxicity Res* 4:281-296.

Kolb B, Gibb R (2010) Tactile stimulation after frontal or parietal cortical injury in infant rats facilitates functional recovery and produces synaptic changes in adjacent cortex. *Behavioral Brain Research* 214:115-120.

Kosten TA, Miserendino MJ, Kehoe P (2000) Enhanced acquisition of cocaine self-administration in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Brain Res* 875:44-50.

Kosten TA, Sanchez H, Zhang XY, Kehoe P (2004) Neonatal isolation enhances acquisition of cocaine self-administration and food responding in female rats. *Behav Brain Res* 151:137-49.

- Kuhar MJ, Ritz MC, Boja JW (1991) The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci* 14:299-302.
- Kuhn CM, Schanberg SM (1998) Responses to maternal separation: Mechanism and mediators. *International Journal of Development & Neuroscience* 16:261-270.
- Laviola G, Macri S, Morley-Fletcher S, Adriani W (2003) Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev* 27:19-31.
- Lemaire V, Lamarque S, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2006) Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 59:768-792.
- Levine S (1957) Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science* 126 (3270):405.
- Levine S, Otis LS (1958) The effects of handling before and after weaning on the resistance of albino rat to later deprivation. *Can J Psycho* 12:103-108.
- Liu D et al (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. *Science* 277:1659-1662.
- Lynch WJ, Mangini LD, Taylor JR (2005) Neonatal isolation stress potentiates cocaine seeking behavior in adult male and female rats. *Neuropsychopharmacology* 30:322-329.
- Marquardt AR, Ortiz-Lemos L, Lucion AB, Barros HMT (2004) Influence of handling or aversive stimulation during rats' neonatal or adolescence periods on oral cocaine self-administration and cocaine withdrawal. *Behavioural Pharmacology* 15:403-412.
- Martin JL, Itzhak Y (2000) 7-Nitroindazole blocks nicotine-induced conditioned place preference but not LiCl-induced conditioned place aversion. *Neuro Report* 11(5):947-9.
- Matthews K, Robbins TW, Everitt BJ, Caine SB (1999) Repeated neonatal maternal separation alters intravenous cocaine self-administration in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)* 141:123-134.
- McIntosh J, Anisman H, Merali Z (1999) Short-and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res* 113:97-106.
- Meaney MJ, Aitken DH, Bhatnagar S, Van Berkel CH, Sapolsky RM (1988) Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with hippocampus. *Science* 239:766-768.
- Meaney MJ, Brake W, Gratton A (2002) Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: A neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? *Psychoneuroendocrinology* 27:127-138.
- Montagu A (1953) The sensory influences of the skin. *Tex Rep Biol Med* 11:292-301.

- Montgomery KC (1955) The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol* 48:254-60.
- Neisewander JL, Pierce RC, Bardo MT (1990) Naloxone enhances the expression of morphine-induced conditioned place preference. *Psychopharmacology* 100(2): 201-5.
- Padoin MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HMT, Lucion AB (2001) Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci* 115:1332-1340.
- Pham TM et al (1999) Effects of environmental enrichment on cognitive function and hippocampal NGF in the non-handled rats. *Behav Brain Res* 103:63-70.
- Plotsky PM, Meaney MJ (1993) Early postnatal experience alters hypothalamic corticotrophin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 18:192-216.
- Pryce CR, Bettschen D, Bahr NI, Feldon J (2001a) Comparison of the effects of infant handling, isolation, and nonhandling on acoustic startle, prepulse inhibition, locomotion, and HPA activity in the adult rat. *Behav Neurosci* 115(1):71-83.
- Pryce CR, Bettschen D, Feldon J (2001b) Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Developmental Psychobiology* 38:239-251.
- Pryce CR, Feldon J (2003) Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanism. *Neurosci Biobehav Rev* 27(1-2):57-71.
- Raineki C et al (2009) Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. *Neuroscience* 159:31-38.
- Rodrigues AL, Arteni NS, Abel C, Zylbersztejn D, Chazan R, Viola G et al (2004) Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res* 1002:94-9.
- Rosenfeld P, Wetmore JB, Levine S (1992) Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of preweanling rats. *Physiol Behav* 52:787-791.
- Sanchez, MM, Ladd CO, Plotsky PM (2001) Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. *Dev Psychopathol* 13:419-449.
- Schanberg SM, Field TM (1987) Sensory deprivation, stress, and supplemental stimulation in the rat pup and preterm human neonate. *Child Dev* 58:1431-47.
- Schapiro S, Vukovich KR (1970) Early experience effects upon cortical dendrites: A proposed model for development. *Science* 167:292-294.
- Schenk S, Lacelle G, Gorman K, Amit Z (1987) Cocaine self-administration in rats influenced by environmental conditions: implications for the etiology of drug abuse. *Neurosci Letters* 81:227-231.

- Silveira PP et al (2005) The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *International Journal of Developmental Neuroscience* 23:93-99.
- Sinha, R (2001) How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berl)* 158:343-359.
- Sinha AR et al (2003) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympatho-adreno-medullary responses during stress-induced and drug cue-induced cocaine craving states. *Psychopharmacology* 170:62-72.
- Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24:417-63.
- Todeschin AS et al (2009) Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Hormones and Behavior* 56:93-100.
- Tzschentke TM (1998) Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol* 56:613-672.
- Tzschentke TM (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction Biology* 12:227-462.
- Vallee M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, Maccari S. (1997) Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci* 17:2626-36.
- van Oers HJJ, de Kloet ER, Whelan T, Levine S (1998) Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *The Journal of Neuroscience* 18:10171-10179.
- Vicentic A et al (2006) Maternal separation alters serotonergic transporter densities and serotonergic 1A receptors in rat brain. *Neuroscience* 140:355-365.
- Weinstock M (2001) Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behavior of the offspring. *Prog Neurobiol* 65:427-451.
- Wigger A, Neumann ID (1999) Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol Behav* 66:293-302.
- Winkellmann-Duarte EC et al (2007) Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. *Brain Research* 1170:20-30.
- Zhang XY, Sanchez H, Kehoe P, Kosten TA (2005) Neonatal isolation enhances maintenance but not reinstatement of cocaine self-administration in adult male rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 177(4):391-9.

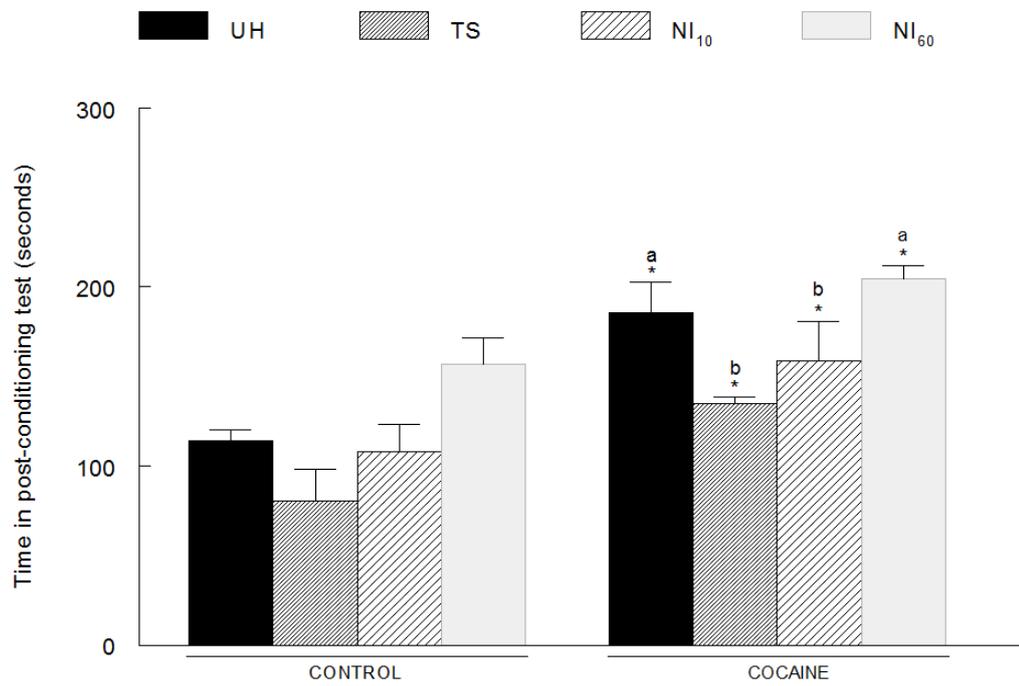


Figure 1

Figure 1 – Effects of neonatal handling on time spent in the cocaine-associated compartment in CPP during post-conditioning test in young rats.

\*Significant difference from control at the same neonatal handling ( $P < 0.05$ ). Different lowercase indicates significant difference between neonatal handling in the same treatment ( $P < 0.05$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M ( $n=7$ ). Abbreviations: UH- unhandled ; TS- tactile stimulation; MS- maternal separation; NI- neonatal isolation. Main effect of handling [ $F(3,48)=9.43$ ;  $P=0.000$ ], drug [ $F(1,48)=29.90$ ;  $P=0.000$ ].

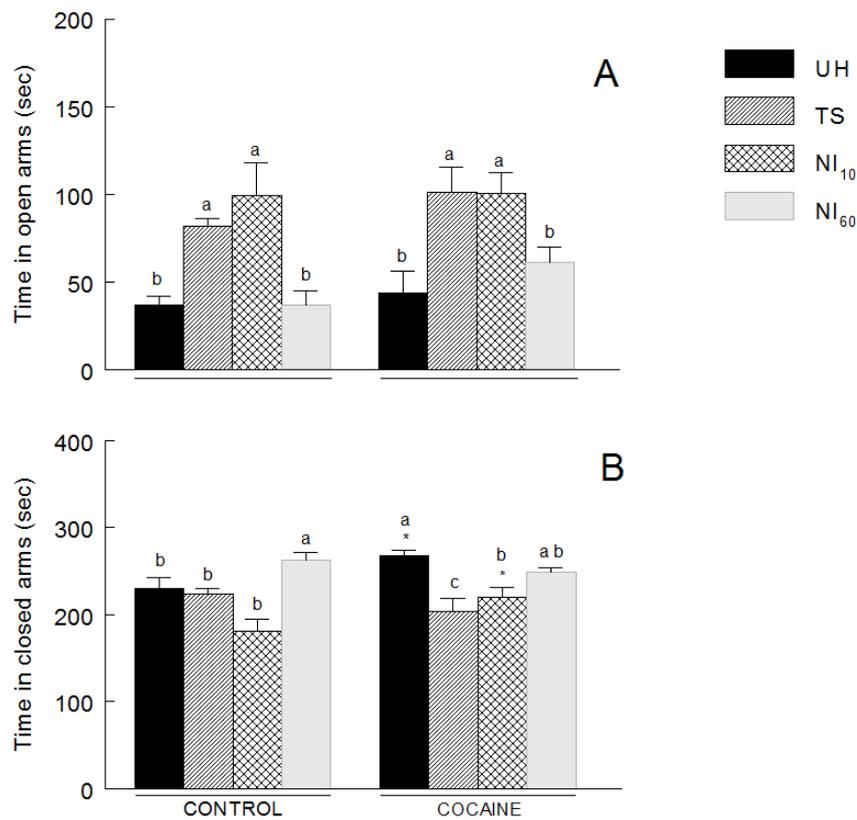


Figure 2

Figure 2 – Effects of neonatal handling on EPM during abstinence of cocaine in young rats. Anxiety-like symptoms were evaluated by time in open (A) and closed (B) arms.

\*Significant difference from control at the same neonatal handling ( $P < 0.05$ ). Different lowercase indicates significant difference between neonatal handling in the same treatment ( $P < 0.05$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M ( $n=7$ ). Abbreviations: UH- unhandled ; TS- tactile stimulation; MS- maternal separation; NI- neonatal isolation. (A) Main effect of handling [ $F(3,48)=13.56$ ;  $P < 0.001$ ]; (B) main effect of handling [ $F(3,48)=12.54$ ;  $P < 0.001$ ] and handling x drug interaction [ $F(3,48)=4.51$ ;  $P < 0.005$ ].

Manuscrito 2 – Em fase de redação

**3.2 Influence of neonatal tactile stimulation on conditioned place preference and anxiety-like symptoms in young rats treated with amphetamine**

Caren T. D. Antoniazzi, Nardeli Boufleur, Geisa S. Dolci, Karine Roversi, Camila S. Pase, Fábio T. Kuhn, Raquel C. S. Barcelos, Dalila M. Benvegnú, Katiane Roversi, Verônica T. Dias, Marilise E. Bürger

## **Influence of neonatal tactile stimulation on conditioned place preference and anxiety-like symptoms in young rats treated with amphetamine**

### **1 Materiais e Métodos**

#### **1.1 Animais**

Foram utilizadas sete ratas Wistar fêmeas com aproximadamente 14 dias de gestação, período que tem sido descrito por apresentar menor responsividade ao estresse (PATIN et al. 2005), e portanto, o período mais adequado para o transporte durante a prenhes. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), e acondicionadas em caixas individuais no Biotério Experimental setorial do departamento de Fisiologia e Farmacologia desta Universidade, em temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), ciclo claro-escuro de 12h e livre acesso à água e alimento. Os animais foram mantidos e usados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal elaborado pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo CIETEA (Comitê de Ética e Bem Estar Animal) da Universidade Federal de Santa Maria (nº 106/2010).

O nascimento das ninhadas foi monitorado diariamente, sendo o dia do nascimento definido como dia pós-natal 0 (DPN0). Todas as ninhadas foram mantidas com as mães até o desmame. Os filhotes machos incluídos nos experimentos foram subdivididos em três grupos experimentais, cuja composição foi estruturada utilizando-se animais provenientes de diferentes ninhadas.

Apenas um filhote macho de cada ninhada foi inserido em cada um dos três grupos experimentais (n=7), não existindo assim animais da mesma ninhada submetidos ao mesmo protocolo, e prevenindo respostas comportamentais inerentes à ninhada. Desta forma, os grupos experimentais foram designados como: estimulação tátil (ET), isolamento neonatal (IN) e não manuseados (NM).

#### **1.2 Protocolo Experimental**

Animais do grupo ET (n=7) foram individualmente submetidos ao protocolo de estimulação adaptado de Levine et al.(1967), entre o DPN1 e DPN21, e que consistiu em um experimentador segurar gentilmente cada filhote e acariciar sua superfície dorsal, no sentido céfalo-caudal, com o dedo indicador, durante 10 minutos (RODRIGUES et al., 2004;

SILVEIRA et al., 2005), para recriar o cuidado materno. O processo foi repetido diariamente, sempre no mesmo horário, entre nove e onze horas da manhã. Ao final de cada sessão, os filhotes foram recolocados no ninho junto com suas mães (ALASMI, PICKENS e HOATH, 1997; RODRIGUES, 2000).

Durante o período DPN1 e DPN21, filhotes designados ao grupo experimental IN (n=7), foram removidos individualmente do ninho e transferidos para caixas plásticas menores, forradas com papel macio e aquecidas por uma lâmpada incandescente de 25w (temperatura próxima aos  $32 \pm 2^\circ\text{C}$ , similar à temperatura do ninho) (CHOU et al., 2001; DENENBERG et al., 1967; LEVINE et al., 1967; RODRIGUES, 2000). Cada filhote permaneceu isolado na caixa menor, afastado da mãe e do restante da sua ninhada, por 10 minutos e todo o processo foi repetido diariamente. O procedimento de IN (adaptado de IMANAKA et al., 2008; KEHOE e BRONZINO, 1999) foi realizado no mesmo período da estimulação tátil, ou seja, entre nove e onze horas da manhã. Ao final do período, os filhotes foram devolvidos às mães.

Os filhotes do grupo NM (n=7) não foram perturbados e permaneceram com as mães durante todo o tempo do experimento. A limpeza das caixas era feita periodicamente, sem que os filhotes fossem tocados.

No DPN22 todos os filhotes foram desmamados, realocados em grupos de 3 e 4 animais por caixa, conforme a manipulação neonatal à qual foram submetidos e mantidos sem nenhuma perturbação até o DPN40, quando todos os animais receberam anfetamina através de um protocolo de preferência condicionada de lugar.

### **1.3 Preferência condicionada de lugar**

O aparato da preferência condicionada de lugar (PCL) consiste em uma caixa dividida em dois compartimentos de tamanhos iguais (45x45x50), acessíveis através de portas guilhotinas acionadas manualmente, a partir de uma área exterior retangular (18x36x50) comum, (adaptado de VAZQUEZ et al., 2006). Um dos compartimentos da caixa tem as paredes pretas e o chão branco e o outro tem paredes brancas, com o chão preto (FUKUSHIRO et al., 2007). A área neutra de acesso aos compartimentos apresenta paredes e chão de cor cinza (VAZQUEZ et al., 2006). A caixa foi colocada em uma sala silenciosa e iluminada indiretamente por uma luz incandescentes de 60w. O número de entradas em cada compartimento foi monitorado e considerado sempre que o animal

estivesse com a cabeça e as duas patas dianteiras na área em questão. O aparato era limpo com álcool 20% antes da entrada de cada animal na caixa.

O procedimento para a PCL consiste em cinco fases: habituação, pré-condicionamento, condicionamento, teste e abstinência (adaptado de FUKUSHIRO et al., 2007 e de VAZQUEZ et al., 2006).

### 1.3.1 Fase de habituação

No DPN 40, cada rato foi removido da sua gaiola e colocado por 15 minutos em cada um dos compartimentos da caixa de PCL, com a finalidade de excluir o comportamento de exploração durante as fases subsequentes. Esta fase é conduzida na ausência da anfetamina.

### 1.3.2 Fase de pré-condicionamento

Realizada com o objetivo de determinar a preferência inicial dos animais por um dos compartimentos (branco ou preto). No DPN41, os animais foram colocados individualmente no centro da área neutra, com livre acesso a todo o aparato, e seu tempo de permanência em cada compartimento foi contado durante 15 minutos. O compartimento em que o rato permaneceu mais tempo foi definido como o inicialmente preferido, enquanto que o compartimento onde ele permaneceu menos tempo foi definido como o compartimento não preferido.

### 1.3.3 Fase de condicionamento

O condicionamento consiste em confinar o animal no compartimento designado durante 25 minutos, imediatamente após uma injeção intraperitoneal de 4 mg/Kg de dl-anfetamina (Merck, Alemanha) ou de salina (0,9%). A anfetamina foi administrada no compartimento oposto ao da preferência inicial, do DPN42 ao DPN49, enquanto a salina era administrada no compartimento preferido inicialmente. Todos os animais recebiam uma administração diária de anfetamina e outra de salina, em períodos alternados, com um intervalo de 4h entre uma administração e outra.

#### 1.3.4 Fase de teste

No DPN 50, o teste para a PCL foi conduzido exatamente como na fase de pré-condicionamento, ou seja, 24h após a finalização da fase de condicionamento e na ausência de droga, os animais tiveram acesso livre aos compartimentos durante 15 minutos, onde foi contabilizado o tempo de permanência em cada compartimento.

#### 1.3.5 Fase de abstinência

Esta última fase foi conduzida no DPN53, ou seja, 96h após a finalização da fase de condicionamento e na ausência de droga, com o objetivo de avaliar os efeitos da abstinência de anfetamina sobre a PCL. Para a execução desta fase, os mesmos procedimentos realizados na fase de teste, descritos no item 1.3.4, foram seguidos.

Os resultados foram expressos como o percentual de tempo que os animais de cada grupo permaneceram no compartimento associado com a droga e no compartimento associado com a salina, na fase de teste e na fase de abstinência.

No DPN50, imediatamente após a fase de teste, os animais foram submetidos ao teste em campo aberto e no DPN53, imediatamente após a fase de abstinência, os animais foram novamente avaliados em campo aberto, seguido de labirinto em cruz elevado e teste da escada.

### **1.4 Teste em campo aberto**

Medidas comportamentais relevantes podem ser acessadas em roedores durante a exploração em um campo aberto (FERNÁNDEZ-TERUEL et al., 2002; MOY et al., 2006; REOLON et al., 2006; SINGER et al., 2005). A tendência natural do animal em um ambiente novo é explorá-lo, apesar do estresse e conflito (HENDERSON et al., 2004). Uma maior emocionalidade dos animais se manifesta em ambientes amplos, onde os roedores por instinto se locomovem perto das paredes, onde se sentem mais protegidos.

Para este experimento foi utilizada uma caixa de madeira (40x40x30) subdividida em 9 quadrantes iguais (KERR et al., 2005), sendo que no DPN50 e DPN53 cada animal foi colocado individualmente no centro do campo aberto e avaliado durante 5 minutos quanto à atividade locomotora (número de quadrantes cruzados horizontalmente - crossing), atividade exploratória (movimentos verticais - rearing) e ansiedade (número de cruzamentos no

quadrante central) (HENDERSON et al., 2004; REOLON et al., 2006; SINGER et al., 2005). A limpeza da arena foi feita com álcool 20% e papel toalha, entre a avaliação de cada animal.

### **1.5 Labirinto em cruz elevado**

O labirinto consiste de 2 braços abertos (10 cm largura x 50 cm de comprimento), sem qualquer anteparo, dispostos em oposição um ao outro e 2 braços fechados (50 cm comprimento x 10 cm largura x 40 cm altura), também opostos, formando uma cruz. Essa cruz é montada em madeira, sobre uma base elevada a 50 cm de altura (LIEBSCH et al., 1995).

Este modelo baseia-se no conhecimento de que ratos e outros roedores evitam locais abertos e elevados e quando ficam confinados nestes ambientes, mostram sinais de medo (congelamento, defecação e micção) e aumento do nível plasmático do hormônio de estresse, a cortisona (GRAEFF e GUIMARÃES, 1999). O rato explora ambos os braços, abertos e fechados do labirinto, mas tipicamente entrará com maior frequência e permanecerá por mais tempo nos braços fechados. Quanto maior a intensidade de ansiedade, menor será a preferência pelos braços abertos (MORATO e BRANDÃO, 1997).

O experimento foi conduzido no DPN 53, baseando-se no método de Pellow et al. (1985), em que o animal é colocado no centro da cruz, com a cabeça voltada para o braço aberto, e os seus movimentos observados por um período de 5 minutos. Os parâmetros avaliados foram: tempo de permanência nos braços fechados, nos braços abertos e no centro, frequência de entradas nos braços abertos ou fechados e número de mergulhos de cabeça. Considera-se que o rato entra num dos braços quando ele está com as 4 patas fora do centro da cruz (área neutra). O número de mergulhos de cabeça é considerado quando o rato, estando no braço aberto, inclina sua cabeça além da borda aberta, para o vão. Após cada experimentação, o aparato foi limpo com álcool 20% e papel toalha.

### **1.6 Teste da escada**

Teste simples e rápido utilizado para avaliar alguns componentes do comportamento exploratório de roedores, e o aparato consiste de uma escada fechada, feita de madeira, contendo 5 degraus, cada um com 2,5cm de altura, 7,5cm de largura e 10cm de comprimento (MOLINENGO e RICCI-GAMALERO, 1970), de modo que a altura total da escada seja 12,5cm. O comprimento total do aparato é de 45cm, cercado com paredes de 25cm de altura. No DPN52, imediatamente após o teste de labirinto em cruz elevado, os animais foram

individualmente colocados no chão da caixa, de costas para a escada e durante um período de 3 minutos foi contabilizado o número de movimentos verticais realizados (rearing) e o número de degraus subidos, por cada rato (THIÉBOT et al., 1973). Entre um animal e outro, o aparato foi limpo com álcool (20%) e papel toalha.

### 1.7 Análise Estatística

A partir dos dados coletados, as médias e erros padrões das médias (E.P.M) de cada grupo foram calculados utilizando o software Statistica, versão 8.0, para Windows. A homogeneidade de variâncias foi determinada através do teste de Levene. Os resultados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) de uma via, com posterior teste de Duncan. O nível de significância mínimo ( $\alpha$ ) adotado foi de 0.05.

## 2 Resultados

*Efeitos do manuseio neonatal sobre a preferência por anfetamina após a exposição e durante a abstinência da droga.*

Após 24h da última injeção de anfetamina/salina, os animais submetidos ao IN permaneceram maior tempo no compartimento associado à anfetamina quando comparados aos grupos ET e NM (Figura 1A). O manuseio neonatal não causou diferenças no tempo gasto no compartimento associado à salina (Figura 1A). Após 96h da última administração de anfetamina/salina, os animais submetidos à ET permaneceram menos tempo no compartimento associado à anfetamina, em relação aos NM e IN, os quais mostram tempo semelhante neste compartimento (Figura 1B). Os diferentes manuseios não causaram diferenças no tempo de permanência dos animais no compartimento associado à salina (Figura 1B).

*Efeitos do manuseio neonatal sobre a atividade locomotora após a exposição e durante a abstinência de anfetamina.*

24 horas após a última administração de anfetamina/salina, os animais do grupo ET e IN apresentaram maior atividade locomotora horizontal do que o grupo NM (Figura 2A). Somente o grupo ET apresentou uma atividade exploratória maior, evidenciada através do número de movimentos verticais, quando comparada aos grupos IN e NM (Figura 2B). Com

relação à atividade locomotora central, os animais estimulados (ET) apresentaram maior número de cruzamentos do que aqueles dos grupos IN e NM (Figura 2C). Após 96h da última administração de anfetamina/salina, os animais submetidos à ET apresentaram maior atividade locomotora horizontal do que os animais NM, e menor atividade locomotora do que os animais submetidos ao IN (Figura 2D). O grupo IN também apresentou maior número de movimentos verticais (Figura 2E), bem como maior número de cruzamentos nos quadrantes centrais (Figura 2F) do campo aberto, quando comparado aos grupos ET e NM.

*Efeitos do manuseio neonatal sobre comportamentos de ansiedade durante a abstinência de anfetamina.*

Após 96h da última administração de anfetamina/salina, os animais submetidos à ET permaneceram maior tempo nos braços abertos (Figura 3A), menor tempo nos braços fechados (Figura 3B) e maior tempo na área central (Figura 3C) do LCE, quando comparados com os animais submetidos ao IN e NM. Estes últimos grupos, por sua vez, não apresentaram diferenças significativas entre si. Os animais do grupo ET apresentaram também maior número de entradas nos braços abertos do LCE do que os grupos IN e NM (Figura 3D), indicando menor grau de ansiedade. O somatório do número de entradas nos braços abertos e fechados foi semelhante entre todos os grupos manuseados (Figura 3E). Adicionalmente, a frequência dos movimentos de mergulhos de cabeça durante o tempo nos braços abertos foi maior no grupo submetido à ET quando comparado ao grupo IN e NM, que não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 3F).

*Efeitos do manuseio neonatal sobre a atividade locomotora e exploratória durante a abstinência de anfetamina.*

Após 96h da última administração de anfetamina/salina, verificou-se um maior número de degraus escalados pelos animais submetidos à ET e ao IN, quando comparados aos animais do grupo NM, sendo que os grupos ET e IN não diferiram entre si (Figura 4A). O número de cruzamentos verticais executados pelo grupo ET foi maior do que para os grupos IN e NM e os animais submetidos ao IN apresentaram ainda um número de movimentos verticais significativamente maiores, do que os animais NM (Figura 4B).

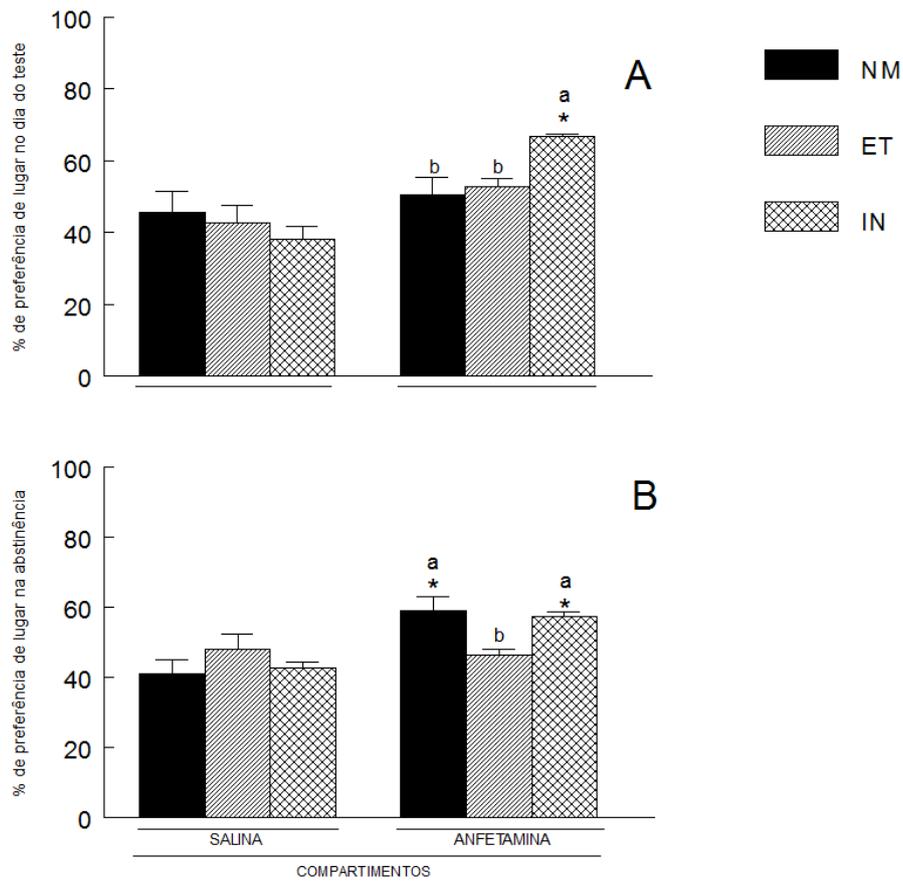


Figura 1

Figura 1 – Efeito do manuseio neonatal sobre a preferência condicionada de lugar, induzida por anfetamina.

\* Diferença significativa da permanência no compartimento associado à salina entre grupos de mesmo manuseio neonatal.

(A) Tempo gasto no compartimento associado à salina e à anfetamina, 24h após a última administração de anfetamina/salina; (B) Tempo gasto no compartimento associado à salina e à anfetamina, 96h após a última administração da droga. Abreviações: MN (não manuseados); ET (estimulação tátil) e IN (isolamento neonatal). Os valores são expressos como média±E.P.M. Letras diferentes indicam diferença significativa entre o tipo de manuseio dentro de cada compartimento ( $P<0,05$ ). Valores de F [F=8,33 e 6,88] para  $P<0,05$  foram determinados em A e B, respectivamente.

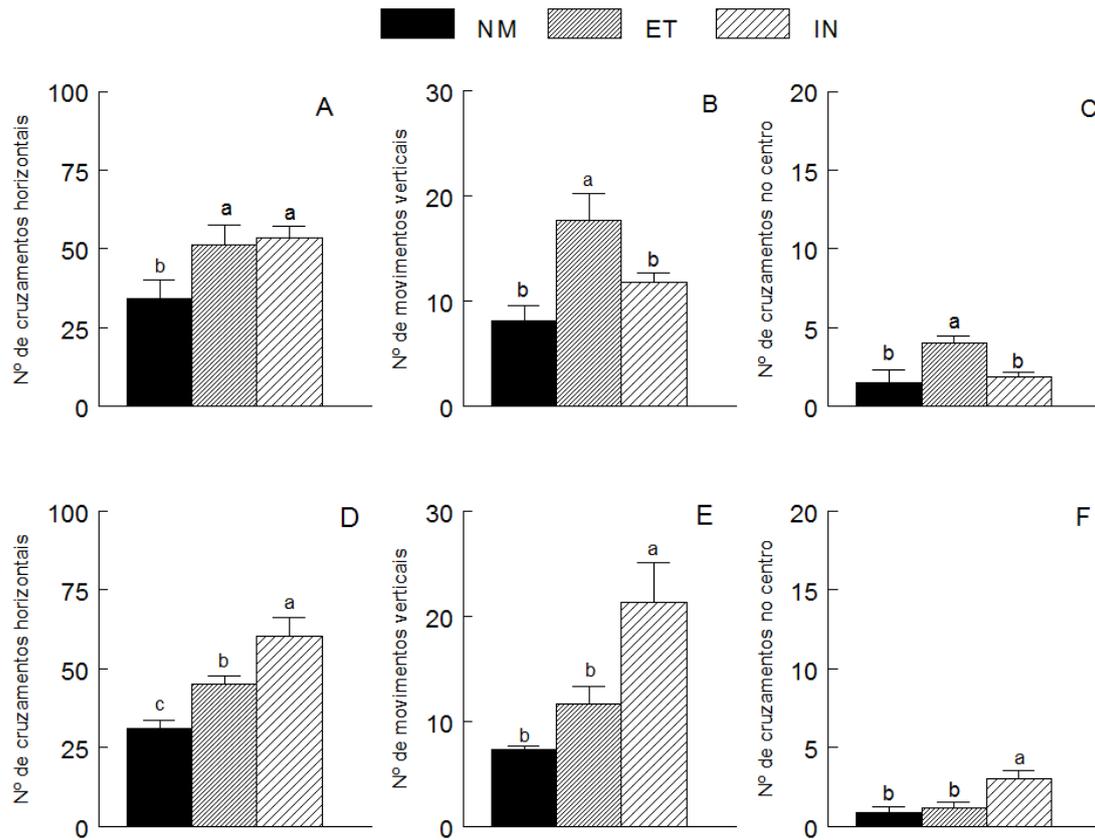


Figura 2

Figura 2 – Efeitos do manuseio neonatal sobre o comportamento de ratos jovens em campo aberto, 24 (2A, 2B e 2C) e 96 (2D, 2E e 2F) horas após a última administração de anfetamina/salina.

Abreviações: MN (não manuseados); ET (estimulação Tátil); IN (isolamento Neonatal). Valores foram expressos como média±E.P.M. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os manuseios, ( $P < 0,05$ ). Valores de F [ $F=3,65$ ;  $7,19$ ;  $5,85$ ;  $8,31$ ;  $8,82$  e  $6,63$  para  $P < 0,05$ ] foram determinados em A, B, C, D, E e F, respectivamente.

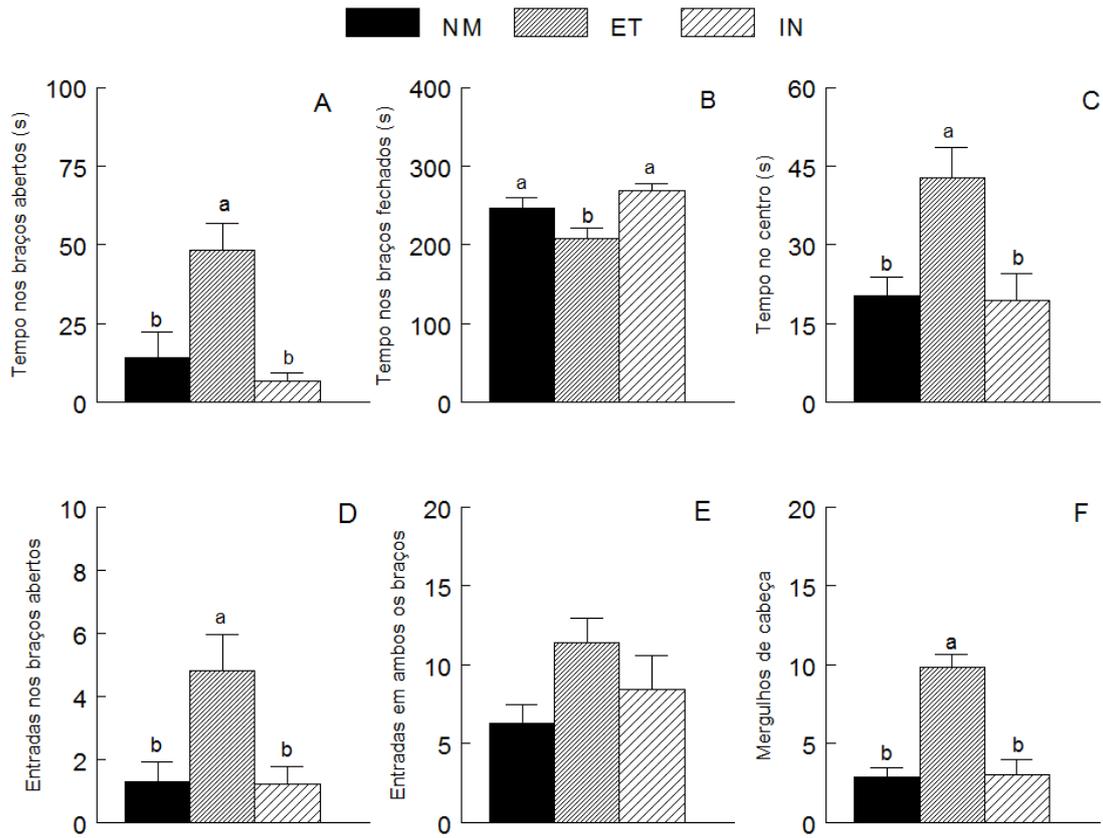


Figura 3

Figura 3 – Efeitos do manuseio neonatal sobre a atividade de ratos jovens no labirinto em cruz elevado, 96h após a última administração de anfetamina/salina.

Abreviações: MN (não manuseados); ET (estimulação Tátil); IN (isolamento Neonatal). Valores foram expressos como média±E.P.M. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os manuseios, ( $P < 0,05$ ). Valores de F [ $F=9,11$ ;  $6,66$ ;  $6,84$ ;  $6,16$ ;  $25,23$  para  $P < 0,05$ ] determinados em A, B, C, D e F, respectivamente.

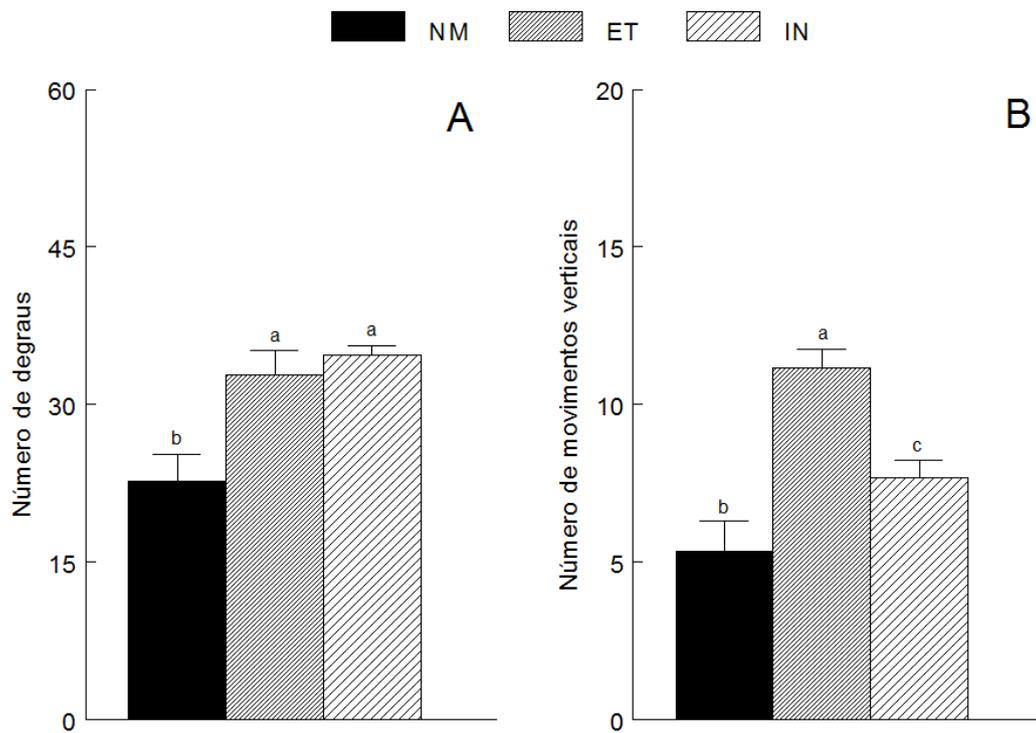


Figura 4

Figura 4 – Efeitos do manuseio neonatal sobre a atividade de ratos jovens no teste da escada, 96h após a última administração de anfetamina/salina.

Abreviações: MN (não manuseados); ET (estimulação Tátil); IN (isolamento Neonatal). Valores foram expressos como média±E.P.M. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os manuseios, ( $P < 0,05$ ). Valores de F [ $F=10,77$  e  $16,33$  para  $P < 0,05$ ] determinados em A e B, respectivamente.

## 4 DISCUSSÃO

Neste estudo tivemos por objetivo avaliar a influência do manuseio neonatal sobre a preferência condicionada de lugar (PCL), induzida por drogas psicoestimulantes em ratos jovens. Além de melhorar a habilidade para enfrentar situações estressantes e reduzir comportamentos de ansiedade, a estimulação tátil (ET) foi capaz de reduzir a preferência por cocaína e anfetamina, como observado no experimento 1 e experimento 2, respectivamente. Esses dados permitem-nos propor que a (ET) e o isolamento neonatal (IN) são capazes de modificar sistemas de recompensa (WEINSTOCK, 2001) e afetar a vulnerabilidade para o abuso de drogas (KOSTEN et al., 2000; SCHENK et al., 1987).

Muitos estudos evidenciaram que eventos traumáticos em períodos iniciais do desenvolvimento podem levar a psicopatologias, tais como ansiedade e estresse, depressão e suscetibilidade à adição na idade adulta (KOEHL et al., 2002; VALLEE et al., 1997), tanto em humanos (ANAND e SCALZO, 2000; HEIM e NEMEROFF, 2001) quanto em animais (LEVINE et al., 1967; SANCHEZ, LADD e PLOTSKY, 2001). Assim, diferentes modelos animais têm sido desenvolvidos na tentativa de compreender a influência deletéria de experiências traumáticas vividas durante o período inicial da existência, representado em nosso estudo pelo IN (IMANAKA et al., 2008). Contrariamente, a ET neonatal vem se destacando por atuar de maneira eficiente sobre a reatividade ao estresse (KABBAJ et al., 2002) e também por ser capaz de reverter e prevenir os efeitos comportamentais e fisiológicos provocados pelo IN (BURTON et al., 2007; CHATTERJEE et al., 2007; LEVINE e OTIS, 1958; LÉVY et al., 2003).

Até o momento, os mecanismos moleculares envolvidos na influência da ET e do IN sobre a preferência às drogas psicoestimulantes, podem apenas ser hipotetizados. Neste sentido, a ET neonatal seria capaz de aumentar a neurogênese (PHAM et al., 1997; SAPOLSKY, 1992), tornando indispensável uma investigação mais aprofundada da sua influência sobre a neuroplasticidade e responsividade frente ao abuso de drogas na idade adulta.

Este estudo também permite pensar que o manuseio neonatal pode modificar comportamentos relacionados aos sintomas de ansiedade (VAN OERS et al., 1998), observados no labirinto em cruz elevado durante o período de abstinência de cocaína (Manuscrito 1) e também de anfetamina (Manuscrito 2 – Resultados parciais). De modo geral, os animais submetidos à ET mostraram melhor desempenho nesta tarefa, onde o manuseio neonatal preveniu o desenvolvimento de sintomas de ansiedade, demonstrando melhor

capacidade de enfrentar situações estressantes (CASOLINI et al., 1997; MEANEY et al., 1991; PHAM et al., 1999), enquanto que o IN resultou em animais mais ansiosos. Interessantemente, a ET representa dois estímulos adicionais em relação ao IN, já que no primeiro manuseio, além do estímulo recebido pelo experimentador, os filhotes também recebem maior atenção e movimentos de limpeza maternos, a qual busca compensar a ausência da cria. Por outro lado, no IN os filhotes não recebem o estímulo do experimentador e tampouco a atenção materna no retorno ao ninho, representando uma perda da interação mãe-filhote, o que pode refletir no amadurecimento do eixo HPA e sobre a neurogênese (CHOU et al., 2001; LIU et al., 1997; RODRIGUES et al., 2004). Assim, este estudo propõe que estas relações maternas também exerçam influência sobre as respostas positivas da ET sobre a menor preferência aos psicoestimulantes e menores sintomas de ansiedade, contrariamente ao que foi observado no grupo de animais submetidos ao IN.

Em resumo, nossos resultados demonstraram que o manuseio neonatal é capaz de promover benefícios em longo prazo, uma vez que o condicionamento de preferência às drogas psicoestimulantes e os testes comportamentais foram realizados quando os animais estavam próximos à idade adulta.

A ET causou benefícios, melhorando a performance comportamental dos animais ao lidar com situações de estresse, atuando de forma preventiva sobre a preferência por drogas psicoestimulantes. De fato, esta resposta não foi observada nos grupos NM e IN, sugerindo assim que a ET pode modificar as respostas frente a situações novas, ou seja, o manuseio neonatal adequado pode representar uma medida promissora na prevenção da ansiedade e da depressão atualmente tratados com medicamentos e psicoterapia.

## 5 CONCLUSÕES

Através dos resultados experimentais obtidos, podemos chegar às seguintes conclusões:

1. De modo geral, a ET foi o manuseio neonatal que apresentou os melhores benefícios.
2. A ET foi capaz de reduzir a preferência condicionada de lugar nos animais tratados com cocaína enquanto o IN não foi prejudicial, permanecendo igual aos animais NM.
3. No tratamento com anfetamina, a ET se mostrou mais efetiva em reduzir a preferência pela droga durante a abstinência de 96h, enquanto o IN mostrou maior prejuízo 24h após a última administração de anfetamina.
4. O manuseio neonatal mostrou-se efetivo ao modificar comportamentos relacionados aos sintomas de medo e ansiedade verificados no LCE durante o período de abstinência de cocaína e também de anfetamina.
5. A ET reduziu os comportamentos de medo e ansiedade no LCE, campo aberto e teste da escada, além de aumentar a atividade exploratória nos mesmos parâmetros.
6. Contrariamente, o IN promoveu aumento nos graus de medo e ansiedade no LCE, campo aberto e teste da escada durante a abstinência da droga. Ainda, o IN reduziu a atividade exploratória no LCE, mas no campo aberto e no teste da escada esta atividade apresentou-se aumentada, acompanhada também pelo aumento da atividade locomotora.
7. O manuseio neonatal foi capaz de produzir benefícios em longo prazo, uma vez que a PCL e os parâmetros comportamentais foram realizados quando os animais estavam próximos à idade adulta.
8. Um adequado manuseio neonatal em estágios iniciais do desenvolvimento, como a ET, promove melhores respostas em situações e ambientes novos, e pode representar uma medida promissora na prevenção da ansiedade e da depressão.

## **6 PERSPECTIVAS**

Novos estudos relacionados aos benefícios da ET devem ser conduzidos em um futuro breve, com a finalidade de avaliar mecanismos de ação da ET neonatal sobre as vias de recompensa, bem como investigar os sistemas neurotransmissores envolvidos e a participação de vias de sinalização celular.

## REFERÊNCIAS

ABROUS, D. N.; KOEHL, M.; Le MOAL, M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. **Physiol. Rev.**, v. 85, p. 523-569, 2005.

AHLSKOG, J. E. Beating a dead horse: dopamine and Parkinson disease. **Neurology**, v. 69, n. 17, p. 1701- 1711, 2007.

ALASMI, M. M.; PICKENS, W. L.; HOATH, S. B. Effects of tactile stimulation on serum lactate in the newborn rat. **Pediatr. Res.**, v. 41, p. 857-861, 1997.

ALLES, G. A. The comparative physiological actions of dl- $\beta$ -phenylisopropylamines. I. pressor effect and toxicity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 47, p. 339-354, 1933.

ALLES, G. A.; PRINZMETAL, M. The comparative physiological actions of dl- $\beta$ -phenylisopropylamines. II. Bronchial effect. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 48, p. 161-174, 1933.

ANAND, K. J.; SCALZO, F. M. Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? **Biol. Neonate.**, v. 77, n. 2, p. 69-82, 2000.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária –. Resolução RDC - Nº 52, de 6 de outubro de 2011. Dispõe sobre a proibição do uso das substâncias anfepramona, femproporex e mazidol. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 7 out. 2011. Disponível em: <http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=10/10/2011&jornal=1&pagina=55&totalArquivos=128>. Acesso em: 16 jun. 2012.

BARDO, M. T.; ROWLETT, J. K., HARRIS, M. J. Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 19, p. 39-51, 1995.

BERMAN, S. M. et al. Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: a review. **Molecular Psychiatry**, v. 14, p. 123-142, 2009.

BISAGNO, V., FERGUSON, D., LUINE, V. N. Chronic d-amphetamine induces sexually dimorphic effects on locomotion, recognition memory, and brain monoamines. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 74, p. 859-67, 2003.

BOESS, F. et al. Effects of cocaine and its oxidative metabolites on mitochondrial respiration and generation of reactive oxygen species. **Biochem. Pharmacol.**, v. 60, n. 5, p. 615- 623, 2000.

BRAKE, W. G. et al. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioral responses to psychostimulants and stressors in adult rats. **Eur. J. Neurosci.**, v. 19, p. 1863-1874, 2004.

BURTON, C. L. et al. Prenatal restraint stress and motherless rearing disrupts expression of plasticity markers and stress-induced corticosterone release in adult female Sprague-Dawley rats. **Brain Res.**, v. 1158, p. 28-38, 2007.

CALDWELL, J. A.; CALDWELL, J. L.; DARLINGTON, K. K. Utility of dextroamphetamine for attenuating the impact of sleep deprivation in pilots. **Aviation Space and Environmental Medicine**, v. 74, p. 1125-1134, 2003.

CAMP, D. M.; DeJONGHE, D. K.; ROBINSON, T. E. Time-dependent effects of repeated amphetamine treatment on norepinephrine in the hypothalamus and hippocampus assessed with in vivo microdialysis. **Neuropsychopharmacology**, v. 17, p. 130-40, 1997.

CASOLINI, P. et al. Effect of increased maternal corticosterone during lactation on hippocampal corticosteroid receptors, stress response and learning offspring in the early stages of life. **Neuroscience**, v. 79, p. 1005-1012, 1997.

CENTRE FOR ADDICTION AND MENTAL HEALTH. **Do you know... Amphetamines.** Toronto. Centre for Addiction and Mental Health, 2004. 2p.

CHAMPAGNE, D. L.; de KLOET, E. R.; JOELS, M. Fundamental aspects of the impact of glucocorticoids on the (immature) brain. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 14, p. 136-142, 2009.

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

CHASIN, A. A. M.; SILVA, E. S. Estimulantes do sistema nervoso central. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. p. 239-257.

CHATTERJEE, D. et al. Maternal isolation alters the expression of neural proteins during development: "stroking" stimulation reverses these effects. **Brain Res.**, v. 1158, p. 11-27, 2007.

CHIUEH, C. C. et al. Intracranial microdialysis of salicylic acid to detect hydroxyl radical generation through dopamine autooxidation in the caudate nucleus: effects of MPP+. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 13, n. 5, p. 581- 583, 1993.

CHOU, I.C. et al. Behavioral/environmental intervention improves learning after cerebral hypoxia-ischemia in rats. **Stroke**, v. 32, p. 2192-2197, 2001.

CIRULLI, A. et al. Early maternal separation increases NGF expression in the developing rat hippocampus. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 59, p. 853-858, 1998.

COFFEY, S. F. et al. Trauma and substance cue reactivity in individuals with comorbid posttraumatic stress disorder and cocaine or alcohol dependence. **Drug Alcohol Dependence**, v. 65, p. 115-127, 2002.

CRITS-CHRISTOPH, P. et al. Dopamine transporter levels in cocaine dependent subjects. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 98, p. 70-76, 2008.

DAVIES, K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochem. Soc. Symp.**, v. 61, p. 1- 31, 1995.

DENENBERG, V. et al. Increases adrenocortical activity in the neonatal rat following handling. **Endocrinology**, v. 81, p. 1047-1052, 1967.

DEVI, B. G.; CHAN, A. W. Cocaine-induced peroxidative stress in rat liver: antioxidant enzymes and mitochondria. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 279, n. 1, p. 359-366, 1996.

DRUMMER, O. H.; ODELL, M. **The forensic pharmacology of drugs of abuse**. London: Arnold, 2001. 462p.

EDWARDS, G.; ARIF, A.; HADGSON, R. Nomenclature and classification of drug-and alcohol-related problems: a W.H.O. Memorandum. **Bull. World Health Organ.**, v. 59, n. 2, p. 225-242, 1981.

FANTONE, J. C.; WARD, P. A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **Am. J. Pathol.**, v. 107, n. 3, p. 395- 418, 1982.

FELITTI, V. J. et al. Relationship of childhood abuse and household dysfunction to many of the leading causes of death in adults: The Adverse Childhood Experiences (ACE) Study. **Am. J. Prev. Med.**, v. 14, p. 245-258, 1998.

FENOGLIO, K. A., BRUNSON, K. L., BARAM, T. Z. Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: functional and molecular aspects. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 27, p. 180-192, 2006.

FERNÁNDEZ-TERUEL, A. et al. Early stimulation effects on novelty-induced behavior in two psychogenetically-select rat lines with divergent emotionality profiles. **Neurosci. Lett.**, v. 137, p. 185-188, 1992.

FERNÁNDEZ- TERUEL, A. et al. A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. **Genome Research**, v. 12, p. 618- 626, 2002.

FIELD, T. Massage therapy effects. **American Psychologist**, v. 53, p. 1270-1281, 1998.

FLEMING, A. S.; O'DAY, D. H.; KRAEMER, G.W. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, p. 637-685, 1999.

FORNSTEDT, B. Role of catechol autooxidation in the degeneration of dopamine neurons. **Acta Neurol. Scand. Suppl.**, v. 129, p. 12- 14, 1990.

FRANCIS, D. D. et al. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 794, p. 136-152, 1996.

FRANCIS, D. D. et al. The role of corticotropin - releasing factor - Norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress. **Biological Psychiatry**, v. 46, p. 1153-1166, 1999.

FRANCIS, D. D.; MEANEY, M. J. Maternal care and the development of stress responses. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 9, p. 128-134, 1999.

FREY, N. B. et al. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. **Bipolar Disord**, v. 8, p. 275-80, 2006.

FUKUSHIRO, D. F. et al. Haloperidol (but not ziprasidone) withdrawal enhances cocaine-induced locomotor activation and conditioned place preference in mice. **Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 31, p. 867-872, 2007.

GIBB, R. L. et al. Tactile stimulation promotes motor recovery following cortical injury in adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 1, p. 102-107, 2010.

- GOMES, C.M. et al. Neonatal handling and productive function in female rats. **J. Endocrinol.**, v. 184, p.435-445, 2005.
- GORDON, H. W. Early environmental stress and biological vulnerability to drug abuse. **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, p. 115-126, 2002.
- GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos da psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, 1999. 246p.
- HALL, F. S. Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. **Cristal Reviews in Neurobiology**, v. 12, p. 129-162, 1998.
- HAND, T. H.; STINUS, L.; LE MOAL, M. Differential mechanisms in the acquisition and expression of heroin-induced place preference. **Psychopharmacology**, v. 98, p. 61-67, 1989.
- HEIM, C.; NEMEROFF, C. B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: Preclinical and clinical studies. **Biological Psychiatry**, v. 49, p. 1023-1039, 2001.
- HENDERSON, N. D. QTL analyses of multiple behavioral measures of anxiety in mice. **Behavior Genetics**, v. 34, p. 267- 293, 2004.
- HERNANDEZ, I. L.; FERNANDEZ, P. L. Anfetaminas. In: LORENZO, P.; LADERO, J. M.; LEZA, J. C.; LIZASOAIN, I. **Drogodependencias**. Madri: Panamericana, 1998. p. 149-156.
- HOFFMAN, D. C. The use of place conditioning in studying the neuropharmacology of drug reinforcement. **Brain Res. Bull.** v. 23, p. 373-387, 1989.
- HUOT, R. L. et al. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long- Evans rats and reversal with antidepressant treatment. **Psychopharmacology (Berlin)**, v. 158, p. 366-373, 2001.
- HUOT, R. L. et al. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. **Brain Research**, v. 950, p. 52-63, 2002.
- IMANAKA, A. et al. Neonatal tactile stimulation reverses the effect of neonatal isolation on open-field and anxiety-like behavior, and pain sensitivity in male and female adult Sprague-Dawley rats. **Behavioural Brain Research**, v. 186, n. 1, p. 91-97, 2008.

INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD – INCB. **Report of the International Narcotics Control Board for 2006**. Disponível em [http://www.incb.org/incb/en/annual\\_report\\_2006.html](http://www.incb.org/incb/en/annual_report_2006.html). Acesso em 15 jul. 2011.

JOHANSON, C. E.; SCHUSTER, R. S. Cocaine In: BLOOM, F. E., KUPFER, D. J. **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**. New York: Raven, 1995. p. 1685- 1697.

JULIEN, R. M. **A primer of drug action: a concise, nontechnical guide to the actions, uses, and side effects of psychoactive drugs**. 8.ed. New York: W. H. Freeman, 1997. 548p.

KABBAJ, M. et al. Stress during adolescence alters behavioral sensitization to amphetamine. **Neuroscience**, v. 113, p. 395-400, 2002.

KALINICHEV, M. et al. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 73, p. 131-140, 2002.

KALIVAS, P. W., STEWART, J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug and stress-induced sensitization of motor activity. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 16, p. 223-44, 1991.

KAUER-SANT'ANNA, M. et al. A gastrin-releasing peptide receptor antagonist blocks d-amphetamine-induced hyperlocomotion and increases hippocampal NGF and BDNF levels in rats. **Peptides**, v. 28, p. 1447-52, 2007.

KEHOE, P.; BRONZINO, J. D. Neonatal stress alters LTP in freely moving male and female adult rats. **Hippocampus**, v. 9, p. 651-658, 1999.

KERR, D.S. et al. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptordependent mechanism. **Psychopharmacology**, v. 179, p. 529-35, 2005.

KNUTH, E. D.; ETGEN, A. M. Long-term behavioral consequences of brief, repeated neonatal isolation. **Brain Res.**, v. 1128, p. 139-147, 2007.

KOEHL, M. et al. Individual vulnerability to substance abuse and affective disorders: role of early environmental influences. **Neurotoxicity Res.**, v. 4, p. 281-296, 2002.

KOSTEN, T. A.; LEE, H. J.; KIM, J. J. Neonatal handling alters learning in adult male and female rats in a task-specific manner. **Brain Research**, v. 1154, p. 144-153, 2007.

KOSTEN, T. A.; MISERENDINO, M. J.; KEHOE, P. Enhanced acquisition of cocaine self-administration in adult rats with neonatal isolation stress experience. **Brain Res**, v. 875, p. 44-50, 2000.

KUHN, C. M.; SCHANBERG, S. M. Responses to maternal separation: Mechanism and mediators. **International Journal of Development & Neuroscience**, v. 16, p. 261-270, 1998.

LADD, C. O. et al. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. **Progress in Brain Research**, v. 122, p. 81-103, 2000.

LEHMANN, J.; FELDON, J. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? **Reviews in Neurosciences**, v. 11, p. 383-408, 2000.

LEMAIRE, V. et al. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 11032-11037, 2000.

LEVINE, S. Infantile experience and resistance to physiological stress. **Science**, v. 126, p. 405-406, 1957.

LEVINE, S. et al. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. **Physiology & Behavior**, v. 2, p. 55-59, 1967.

LEVINE, S.; OTIS, L. S. The effects of handling before and after weaning on the resistance of albino rat to later deprivation. **Can. J. Psychol.**, v. 12, p. 103-108, 1958.

LEVINE, S. et al. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. **Dev. Psychobiol.**, v. 24, p. 547-558, 1991.

LÉVY, F. et al. Complete maternal deprivation affects social, but not Spatial, learning in adult rats. **Developmental Psychobiology**, v. 43, p. 177-191, 2003.

LIEBSCH, G. et al. Chronic infusion of a CRH 1 receptor antisense oligodeoxynucleotide into the central nucleus of the amygdala reduced anxiety-related behavior in socially defeated rat. **Regul. Peptides**, v. 59, p. 229-239, 1995.

LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. **Science**, v. 277, p. 1659-1662, 1997.

MADRAS, B. K.; MILLER, G. M.; FISCHMAN, A. J. The dopamine transporter and attention-deficit-hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, p. 1397-1409, 2005.

MATSUMOTO, T. et al. Methamphetamine in Japan: the consequences of methamphetamine abuse as a function of route of administration. **Addiction**, v.97, p. 809, 2002.

McEWEN, B. S. Early life influences of life-long patterns of behavior and health. **Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.**, v. 9, p. 149-154, 2003.

MEANEY, M. J.; BRAKE, W.; GRATTON, A. Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: A neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, p. 127-138, 2002.

MEANEY, M. J. et al. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 697, p. 70-85, 1993.

MEANEY, M. J. et al. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. **Dev. Neurosci.**, v. 18, p. 49-72, 1996.

MOFFETT, M. C. et al. Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 321-330, 2007.

MOLINENGO, L.; RICCI-GAMALERO, S. The “staircase maze” and the “simple staircase” in the analysis of the psychopharmacological action of CNS depressants. **Pharmacology**, v. 4, p. 169-78, 1970.

MONTAGU, A. The sensory influences of the skin. **Tex. Rep. Biol. Med.**, v. 11, p. 292-301, 1953.

MORATO, S.; BRANDÃO, M. L. Paradoxal increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed to two kinds of aversive stimuli. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 30, p. 1113-1120, 1997.

MOY, S. S. et al. Mouse models of autism spectrum disorders: the challenge for behavioral genetics. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 142, p. 40- 51, 2006.

NEISEWANDER, J. L.; PIERCE, R. C.; BARDO, M. T. Naloxone enhances the expression of morphine-induced conditioned place preference. **Psychopharmacology**, v. 100, p. 201-205, 1990.

NESTLER, E. J.; AGHAJANIAN, G. K. Molecular and cellular basis of addiction. **Science**, v. 278, p. 58-63, 1997.

NICOLA, S. M.; SURMEIER, D. J.; MALENKA, R. C. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 23, p. 185- 215, 2000.

NNADI, C. U. et al. Neuropsychiatric effects of cocaine use disorders. **J. Natl. Med. Assoc.**, v. 97, n. 11, p. 1504- 1515, 2005.

O'BRIEN, C. P. Drug addiction and abuse. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed.). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11. ed. New York: Pergamon, 2006. p. 621- 642.

O'DONNELL, P. Dopamine gating of forebrain neural ensembles. **Eur. J. Neurosci.**, v. 17, p. 429- 435, 2003.

PADOIN, M. J. et al. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavioral of rats. **Behav. Neurosci.**, v. 115, p. 1332-1340, 2001.

PATIN, V. et al. Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. **Developmental Brain Research**, v. 160, p. 265-274, 2005.

PELEG-RAIBSTEIN, D. et al. The amphetamine sensitization model of schizophrenia: relevance beyond psychotic symptoms. **Psychopharmacology (Berlin)**, v. 206, p. 603-21, 2009.

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

PHAM, T. M. et al. Effects of neonatal stimulation on later cognitive function and hippocampal nerve growth factor. **Behav. Brain. Res.**, v. 86, p. 113-120, 1997.

PHAM, T. M. et al. Effects of environmental enrichment on cognitive function and hippocampal NGF in the non-handled rats. **Behav. Brain. Res.**, v. 103, p. 63-70, 1999.

PLOJ, K. et al. Basal levels and alcohol-induced changes in nociceptin/orphanin FQ, dynorphin, and enkephalin levels in C57BL/6J mice. **Brain Research Bulletin**, v. 53, p. 219-226, 2000.

PLOJ, K.; ROMAN, E.; NYLANDER I. Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats. **Neuroscience**, v. 121, p. 787-799, 2003a.

PLOJ, K.; ROMAN, E.; NYLANDER, I. Long-term effects of short and long periods of maternal separation on brain opioid peptide levels in male Wistar rats. **Neuropeptides**, v. 37, p. 149-156, 2003b.

PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin- releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF contents and stress-induced release in adult rats. **Molecular Brain Research**, v. 18, p. 195-200, 1993.

PLOTSKY, P. M. et al. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotrophin releasing factor systems in adult male rat offspring. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 2192-2204, 2005.

PRINZMETAL, M.; BLOOMBERG, W. The use of Benzedrine for the treatment of narcolepsy. **Journal of the American Medical Association**, v. 105, p. 2051-2054, 1935.

PRYCE, C.R.; BETTSCHEN, D.; FELDON, J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. **Developmental Psychobiology**, v. 38, p. 239-251, 2001.

RAINEKI, C. et al. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. **Neuroscience**, v. 159, n. 1, p. 31-38, 2009.

REOLON, G. K. et al. Long-term memory for aversive training is impaired in Idual (-/-) mice, a genetic model of mucopolysaccharidosis type I. **Brain Research**, v. 1076, p. 225-230, 2006.

RICHARDSON, N.; ROBERTS, D. C. Progressive ratio schedules in drug self-administration study in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. **J. Neurosci. Methods**, v. 66, p. 1- 11, 1996.

ROBINSON, T. E., KOLB, B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. **Neuropharmacology**, v. 47(Suppl. 1), p. 33-46, 2004.

RODRIGUES, A. L. **Efeitos morfológicos e comportamentais da estimulação tátil em ratos submetidos à hipóxia-isquemia neonatal**. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Neurociências)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

RODRIGUES, A. L. et al. Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. **Brain Research**, v. 1002, n. 1-2, p. 94-99, 2004.

ROTHMAN, R. B. et al. Amphetamine –type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. **Synapse**, v. 39, n. 1, p. 32-41, 2001.

SAPOLSKY, R. M. **Stress, the Aging Brain, and the Mechanisms of Neuron Death**. Londres: MTI Press, 1992.

SANCHEZ, M. M.; LADD, C. O.; PLOTSKY, P. M. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. **Dev. Psychopathol.**, v. 13, p. 419-449, 2001.

SCHENK, S. et al. Cocaine self-administration in rats influenced by environmental conditions: implications for the etiology of drug abuse. **Neurosci. Lett.**, v. 81, p. 227-231, 1987.

SEIDEN, L. S.; SABOL, K. E. Amphetamine – effects on catecholamine systems and behavior. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 33, p. 639-677, 1993.

SILVEIRA, P. P. et al. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 93-99, 2005.

SINGER, J. B. et al. Mapping quantitative trait loci for anxiety in chromosome substitution strains of mice. **Genetics**, v. 169, p. 855-862, 2005.

SINHA, R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 158, p. 343-359, 2001.

SINHA, R. et al. Psychological stress, drug-related cues and cocaine craving. **Psychopharmacology**, v. 152, p. 140-148, 2000.

SINHA, R. et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympatho-adreno-medullary responses during stress-induced and drug cue-induced cocaine craving states. **Psychopharmacology**, v. 170, p. 62-72, 2003.

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

STEPHAN, M. et al. Postnatally induced differences in adult pain sensitivity depend on genetics, gender and specific experiences: Reversal of maternal deprivation effects by additional postnatal tactile stimulation or chronic imipramine treatment. **Behav Brain Res.**, v. 133, p. 149-158, 2002.

SUNDSTRÖM, O.; SVEDBERG, L. E.; CARLING, L. Meningitis caused by metronidazole. **Lakartidningen**, v. 81, n. 39, p. 3480, 1984.

SWAIN, J. E. et al. Brain basis of early parent-infant interactions: psychology, physiology, and in vivo functional neuroimaging studies. **J. Child Psych. Psychiatry**, v. 48, p. 262-287, 2007.

THIÉBOT, M.H. et al. Dissociation of two components of rat behaviour by psychotropic drugs. Utilization for studying anxiolytic drugs. **Psychopharmacology**, v. 31, p. 77-90, 1973.

TODESCHIN, A. S. et al. Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. **Hormones and Behavior**, v. 56, p. 93-100, 2009.

TZSCHENTKE, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. **Prog. Neurobiol.**, v. 56, p. 613-672, 1998.

TZSCHENTKE, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. **Addiction Biology** v. 12, p. 227-462, 2007.

UNODC. 2008 World Drug Report. In: Report UN, editor.: United Nation. 2008. p. 310.

VALLEE, M. et al. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. **J Neurosci**, v. 17, p. 2626-36, 1997.

VAN OERS, H.J. J. et al. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 10171-10179, 1998.

VAZQUEZ, V. et al. Brief early handling increases morphine dependence in adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 170, p. 211-218, 2006.

VICENTIC, A. et al. Maternal separation alters serotonergic transporter densities and serotonergic 1A receptors in rat brain. **Neuroscience**, v. 140, n.1, p. 355-365, 2006.

VILLESAS, R. et al. Effect of handling on maternal behavior following return of pups to the nest. **Developmental Psychobiology**, v. 10, p. 323-329, 1977.

WEINSTOCK, M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behavior of the offspring. **Prog Neurobiol**, v. 65, p. 427-451, 2001.

WINKELLMANN-DUARTE, E.C. et al. Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. **Brain Research**, v. 1170, p. 20-30, 2007.

YONAMINE, M. **A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais**. 2004. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ZHANG, L. et al. Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain. **Developmental Brain Research**, v. 133, p.1-11, 2002.