

INFLUÊNCIA DA PINEAL E DO NERVO ÓPTICO NA LACTAÇÃO DE RATOS

MARCELO QUESADO FILGUEIRAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Ecologia Animal)

Juiz de Fora
Minas Gerais – Brasil
Abril de 1999

INFLUÊNCIA DA PINEAL E DO NERVO ÓPTICO NA LACTAÇÃO DE RATOS

MARCELO QUESADO FILGUEIRAS

Orientadora: PROF. DRA. MARTHA
DE OLIVEIRA GUERRA

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Ecologia Animal)

Juiz de Fora
Minas Gerais – Brasil
Abril de 1999

INFLUÊNCIA DA PINEAL E DO NERVO ÓPTICO NA LACTAÇÃO DE RATOS

MARCELO QUESADO FILGUEIRAS

Orientadora: PROF. DRA. MARTHA
DE OLIVEIRA GUERRA

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Ecologia Animal), **APROVADA** em ___ de _____ de 1999.

Prof. Dr. CARLOS ALBERTO REDINS
Universidade Federal do Espírito Santo

PROF. Dr. LUIZ CARLOS BERTDGES
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dra. MARTHA DE OLIVEIRA GUERRA
Universidade Federal de Juiz de Fora

À minha esposa e filhos pelas
horas que lhes foram furtadas
e muito bem compreendidas.

AGRADECIMENTOS

À **FAPEMIG**, pelo incentivo recebido na forma de Bolsa de apoio à pesquisa.

À **Professora Rita de Cássia Silveira e Sá**, pela tradução do resumo em inglês.

À **Professora Dra. Vera Maria Peters**, pela acolhida no CBR e pelas sugestões sempre bem vindas.

Ao **Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF**, pelo fornecimento dos animais de experimentação.

À **Professora Dra. Martha de Oliveira Guerra**, como orientadora, pela paciência e exemplo.

ÍNDICE

RESUMO	viii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 - COMPORTAMENTO REPRODUTIVO – ASPECTOS FISIOLÓGICOS	6
2.2 - GLÂNDULA PINEAL.	7
2.2.1. Embriologia, anatomia e histologia.	7
2.3.FISIOLOGIA	10
2.3.1.- Primeiras observações.	10
2.3.2. - Mecanismos de síntese e controle da secreção da melatonina.	11
2.3. 3 - Pineal e Reprodução.	20
2.3. 4 – Ritmos circadianos e comportamento reprodutivo.	24
3. MATERIAL E METODOLOGIA	29
3. 1 - Material	29
3. 3 - Desenho experimental	30
3. 3.1 - Organização dos grupos experimentais	30
3. 3.2. - Procedimento cirúrgico	30
3. 3.2.1 - Anestesia	31
3. 3.2.2 - Técnica Operatória	31
Secção de nervo óptico:	31
Pinelectomia (Modificado de HOFFMAN & REITER, 1965 e WAYNFORTH, 1980).	32
Operações simuladas.	46
3.3.3 - Observações pós-operatórias	46
3.3.4. - Variáveis maternas observadas.	46
3. 3.5 - Acompanhamento das ninhadas.	47
3. 3.6 - Avaliação do Crescimento e Desenvolvimento das Crias.	47
3. 3.7 - Avaliação do consumo de leite	48
3. 3.8. - Determinação do início da Puberdade.	48
3. 3.9 – Processamento estatístico.	49
4. RESULTADOS	51
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÃO	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

RESUMO

RESUMO

Os ritmos circadianos são funções cíclicas importantes na orientação temporal do animal em relação as estratégias reprodutivas a serem adotadas ao longo do ano. O principal ritmo utilizado para a sincronização com o meio é o ritmo claro-escuro ou fotoperíodo. Um dos componentes importantes desse ritmo é a glândula pineal que faz a transdução do estímulo fótico em secreção hormonal de melatonina. Esta informa a órgãos alvo como o núcleo supraquiasmático e hipófise, que emitem sinais neurais ou hormonais que sincronizam o comportamento, inclusive o reprodutivo, que depende do fotoperíodo. Neste trabalho estuda-se a influência da luz no comportamento de lactação e no desenvolvimento pós-natal de crias de ratas Wistar submetidas à procedimentos que alteram a percepção de sinais luminosos. As ratas, obtidas no Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF, no 20^o dia de gestação, foram submetidas à pinealectomia, secção de nervo óptico, pinealectomia + secção de nervo óptico e à exposição constante à luz. Os controles foram constituídos de operações simuladas e um grupo de ratas da colônia, expostas às condições normais de criação. Avaliaram-se as condições clínicas maternas, os índices de mortalidade materna e o consumo de ração. Entre as crias procedeu-se a pesagem nos dias do nascimento, ao 5^o, 14^o, 25^o, anotação de mortes nos mesmos dias e a avaliação da ingesta de leite no 14^o dia, pelo método de diferença de peso corporal antes e após 30 minutos da mamada. Os resultados indicam que a alteração da fotoperiodicidade materna afeta o desenvolvimento das crias, acarreta maior índice de mortalidade entre elas e causa retardo na puberdade.

SUMMARY

SUMMARY

The circadian rhythm comprises cyclic functions important for the animal temporal orientation regarding the reproductive strategies to be adopted along of the year. The principal rhythm used for the synchronization with the environment is the light-dark rhythm or photoperiod. One of major components of this rhythm is the pineal gland, which is responsible for the transduction of the photic stimulus into the hormonal secretion of melatonin. Melatonin stimulates target organs such as the suprachiasmatic nucleus and the pituitary gland to send behaviour-synchronizing-neural and hormonal signals, which synchronize the photoperiod-dependent-reproductive behaviour. In the present work, the study of light influence in the lactation behaviour and the post-natal development of Wistar rats (*Rattus norvegicus*, BERKENHOUT, 1769), offsprings was carried out, using mothers that had been submitted procedures which interfered with their perception to light. 20-day-pregnant Wistar rats, obtained from the CBR vivarium of UFJF, underwent pinealectomy, section of optic nerve, pinealectomy and optic nerve section and constant exposure to light. The control animals underwent simulated operations and another group of female rats from the colony were kept under normal conditions of care. The clinical maternal conditions, the maternal mortality indices and food consumption were analysed. The offsprings were weighed on the birth, 5, 14 and 25th days, and the deaths observed in these days were noted. Milk consumption on the 14th day was also analysed by comparison of body weight 30 min before and after feeding. The results indicate that the alteration of the maternal photoperiodicity affects the development of offsprings, increases the mortality rate among them and causes puberty delay.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os padrões de reação de um animal às solicitações do meio são o resultado de processos evolutivos originados pela seleção natural, tendo como manifestação o que é denominado de comportamento, este é mediado pelos dois sistemas integradores, o sistema nervoso e o sistema endócrino proporcionando as bases fisiológicas do comportamento. Os neurônios mediam respostas adaptativas rápidas, pré-programadas e os hormônios afetam o comportamento controlando o "status" fisiológico ideal para o desenvolvimento do organismo e adaptações continuadas. Ambos os sistemas são integrados e funcionam dentro de ritmos biológicos (VILLEE, WALKER, BARNES, 1985).

Os ritmos circadianos são funções cíclicas com periodicidade de cerca de 24 horas, gerados por fatores endógenos e exógenos. O fator exógeno mais importante é o ritmo de luz e escuridão (MOORE, 1990,).

A evolução orgânica desenvolveu várias funções adaptativas, fundamentais no ritmo claro-escuro assim como, ciclo vigília-sono, secreção de adrenocorticóides, temperatura corporal, ciclos de secreção de hormônios hipofisários, dentre estes a prolactina, e o ciclo de secreção da glândula pineal. Com a remoção do estímulo visual os ritmos continuam, porém com períodos diferentes, o que indica que não são dependentes unicamente do ciclo claro-escuro.

A organização temporal dos processos fisiológicos e do comportamento, inclusive o reprodutor, ocorre por efeito de um sistema de sincronismo circadiano que consta de 3 componentes principais:

1. Componente visual composto de fotorreceptores que emitem vias aferentes ao trato retino-hipotalâmico e genículo-hipotalâmico.
2. Marca-passos hipotalâmicos, que geram os sinais do ritmo circadiano.

3. Vias eferentes primárias que saem dos marca-passos e vão aos sistemas efetores que exercem a função sincronizadora (MOORE, 1992; MENAKER, MOREIRA & TOSINI, 1997; MOORE, 1992, 1992, 1996, 1997).

Afetando toda a fisiologia do animal, estes ritmos biológicos também contribuem para o bom desempenho nos cuidados parentais das crias.

Os cuidados parentais são fundamentais para a sobrevivência da cria, principalmente nestas espécies altriciais, ou seja, aquelas que dependem dos cuidados porque sua prole é pouco desenvolvida ao nascimento (NUMAN, 1994). O grau de desenvolvimento dos filhotes ao nascimento tem importante influência nos vários graus de cuidados parentais. As crias podem ser precoces e móveis ao nascer ou ter vários níveis de dependência. Todos os filhotes de mamíferos dependem dos cuidados parentais, e o comportamento materno aumenta a chance de sobrevivência da cria até que a maturidade necessária seja alcançada.

O comportamento materno é desencadeado por estímulos, processados pelos transdutores neuroendócrinos, que interagem com os estímulos internos, representados por hormônios, particularmente a prolactina (NUMAN, 1988, 1994).

Os fatores externos que se relacionam aos padrões de comportamento envolvem: **a temperatura**, que ao baixar estimula o comportamento de construir e reestruturar o ninho quando necessário; **sons** que emitidos pelas crias estimulam a lactação e outros comportamentos maternos; estímulos táteis no **órgão vomeronasal** que desencadeiam o comportamento de recuperação da cria; a **luminosidade**, determinando os ciclos ambientais e **fatores químicos** como os odores importantes para o reconhecimento das crias (NUMAN, 1988, 1994).

4. A luz, por participar ativamente no ritmo claro-escuro, é um fator particularmente significativa. Sua ação é mediadora da função da pineal (MENAKER, MOREIRA & TOSINI, 1997; REDMAN & FRANCIS, 1998).

A pineal dos mamíferos, que durante o processo evolutivo perdeu seus fotorreceptores e se transformou numa glândula endócrina, manteve suas funções reguladas pela luminosidade ambiente e transformou-se num importante transdutor neuroendócrino (MENAKER, 1985; AXELROD, 1992).

Tem-se atribuído à glândula pineal funções relacionadas à produção de hormônios hipofisários e esteroidianos (entre outros) e por meio desta modulação, a possibilidade de afetar a reprodução (GUYTON, 1989). Demonstrou-se também que a glândula pineal pode inibir a síntese de prolactina (ANTON-TÁY, 1971) o que associado à sua capacidade de inibir hormônios esteroidianos (FORSLING et al., 1993; AKIYAMA, MORIYA & SHIBATA, 1998) poderia indicar sua influência sobre o processo de lactação e outros comportamentos maternos.

Sabendo-se que a melatonina - principal hormônio produzido pela glândula pineal - é responsável pelos efeitos acima mencionados e tem sua síntese e liberação regulada pela luz, pode-se hipotetizar que alterações da percepção luminosa possam influir no comportamento materno e na sobrevivência das crias (GUERRA et al., 1973; GUERRA E ANDRADE, 1975a; GUERRA & ANDRADE, 1975b).

Neste trabalho pretendeu-se observar se o comportamento materno e o desenvolvimento das crias se altera quando:

1. Remove-se a pineal.
2. Seciona-se o nervo óptico.
3. Combina-se a remoção da pineal com a secção do nervo óptico.
4. Expõem-se as ratas a luz constante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - COMPORTAMENTO REPRODUTIVO – ASPECTOS FISIOLÓGICOS

A comunicação interespecífica informando quando o animal está pronto para a reprodução se dá por meio de sinais luminosos que estimulam fotorreceptores (LEON, 1985, MARTINET & ALLAIN, 1985), receptores táteis (STERN & JOHNSON; 1989 STERN & KOLUNIE, 1989) e olfativos(MAYER & ROSENBLATT, 1993), sendo os últimos via ferormônios. Os ferormônios teriam papel também na aceleração ou retardamento do início da puberdade, enquanto que nos adultos estimulariam o ciclo ovariano e o comportamento do macho (VANDENBERGH, 1988). Os ciclos estral e menstrual que ocorrem nas fêmeas de mamíferos são regulados pela ação do LH e FSH, e estes pelo hipotálamo, integrado com mecanismos geradores de ritmos circadianos, localizados nos núcleos supraquiasmáticos (YEN, 1990; MOORE, 1990, 1992, 1996, 1997; VUILLEZ et al., 1998)

O comportamento reprodutivo de um indivíduo visa a perpetuação de seus genes, pelo menos na geração seguinte, e a possibilidade de sobrevivência da espécie. O início do comportamento sexual se dá na puberdade, acompanhando o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários. Se ele for bem sucedido ocorrerá a fecundação e a gestação culminará no parto, seguindo-se a lactação da cria e seu preparo para o novo ciclo.

Na maioria dos animais os estímulos recebidos do meio ambiente como sensação tátil, umidade, temperatura e luminosidade, geralmente são transformados por transdutores neuroendócrinos em hormônios, que irão alterar e desencadear mudanças que, associadas ao relógio biológico interno, vão determinar o desenvolvimento psicomotor, ponderal, gonadal e modificar comportamentos que permitirão o acasalamento e os cuidados parentais (SORRENTINO, JAN, SCHALCH, 1970; VILLEE, WALKER, BARNES, 1985; CORODIMAS, 1993; ROBERTS, XIE & MATHIALAGAN, 1996; KUMAR, 1997).

Os componentes básicos do comportamento materno podem ser divididos em **padrões direto e indireto**. Os padrões diretos são definidos pela atuação efetiva da mãe sobre o filhote, como a amamentação, com função de fornecer alimento e proteger as crias da perda de calor excessiva e comportamento de recuperação, que é o ato de trazer de volta ao ninho filhotes que porventura saiam fora dos limites do ninho. Os **padrões indiretos** são fatores que contribuem para o cuidado com a cria, neles são incluídos a construção do ninho e comportamento de agressão materna (BRIDGES, 1990; CORODIMAS, 1993; MAYER & ROSENBLATT, 1990; FACTOR, MAYER & ROSENBLATT, 1993; NUMAN, 1994).

O comportamento direto inicia-se com o nascimento da prole e é dependente de fatores neurais e hormonais. O comportamento indireto recebe além de interferência interna, a influência de fatores externos (NUMAN, 1988, 1995). Entre os fatores endócrinos que influenciam o comportamento materno destacam-se a prolactina e o lactogênio placentário (cujas concentrações plasmáticas aumentam a partir do final da gravidez), e do estrogênio e a progesterona que tem uma redução brusca no início do trabalho de parto, o que parece dar início a padrões fixos de comportamento materno, atuando como facilitadores do comportamento neural (BRIDGES et al., 1990; MAYER, AD & ROSENBLATT, 1990; NUMAN, 1990; NUMAN & NUMAN, 1991; CORODIMAS et al., 1993; McCARTHY, CURRAN & SIEGEL, 1994; NUMAN, 1994).

2.2 - GLÂNDULA PINEAL.

2.2.1. Embriologia, anatomia e histologia.

A glândula pineal é conhecida desde a antiguidade já sendo mencionada nos estudos anatômicos de Galeno (THIEBLOT, 1947). De longa

data é relacionada às funções misteriosas e metafísicas, sendo alvo de estudo mais dos filósofos que dos anatomistas até o século XIX, quando PEYTORREAU (*apud* THIEBLOT, 1947), iniciou a fase de estudos científicos sobre a pineal e suas funções (THIEBLOT, BERTHELAY, BLAIRE, 1966; SHORT, 1985).

A pineal tem sua origem embriológica partir de um divertículo evaginado do tecto do III ventrículo, partindo da linha média entre a comissura habenular anteriormente e posteriormente ao órgão subcomissural e a comissura posterior (WURTMANN, AXELROD & KELLY, 1968; MACHADO, 1993). A diferenciação embriológica ocorre na fase embrionária, a partir do espessamento da parede da vesícula diencefálica, até se tornar uma formação sólida com agregado de células foliculares. A diferenciação celular produz então células especializadas, os pinealócitos, com função neurosecretora (THIEBLOT, 1947; WURTMANN, AXELROD & KELLY, 1968; AXELROD, 1992; MACHADO, 1993).

A presença da pineal ou tecidos compatíveis com pinealócitos aparece na escala evolutiva a partir dos peixes, nas salamandras, serpentes, algumas tartarugas e aves e em mamíferos, a pineal é única sem a presença do órgão parapineal (WURTMANN, AXELROD & KELLY, 1968).

Nos vertebrados inferiores a pineal, pode ser considerada como um sistema composto de duas partes, a pineal ou epífise propriamente dita, sendo uma estrutura vesicular, e o órgão parapineal, que se localiza a nível extracraniano e superficial, ímpar e mediano tendo tecidos semelhantes à fotorreceptores das células da retina, com função sensorial. O órgão parapineal emite fibras que atravessam forames existentes no crânio e que vão até a epífise, integrando um circuito de informação do ritmo claro-escuro (WURTMANN, AXELROD & KELLY, 1968; MENAKER, 1985; MACHADO, 1993).

Em mamíferos pineal, epífise ou corpo pineal, é uma estrutura endócrina com o formato de uma pinha (daí o seu nome), localizada dentro do sistema nervoso central ao nível do epitélamo, ou seja, na parte superior e

posterior do diencéfalo, alojada sobre o mesencéfalo, entre os dois tálamos, com sua base inserida por meio de uma curta haste à comissura das habênulas (RANSON & CLARK, 1968).

É vascularizada por uma rede capilar, organizada pelo parênquima, formando um eixo central, com seus capilares apresentando fenestrações e a característica de não ter barreira hemoencefálica (WURTMANN, AXELROD & KELLY, 1968; MACHADO, 1993). O fato de não ter barreira hematoencefálica implica, que as trocas de substâncias entre os tecidos e os vasos e efetuada de modo mais rápido e fácil. Principalmente no homem a vascularização da pineal é superada em fluxo apenas pelo rim. (MACHADO, 1993)

A inervação é feita por fibras simpáticas pós-ganglionares provenientes do gânglio cervical superior, do tronco simpático, que sobem junto com a artéria carótida interna, passando ao longo da superfície do hipotálamo rente a tenda do cerebelo e entram no ápice da glândula como os *nervii coronarii* (VOLLRATH, 1985; KLEIN, 1985), e vão terminar próximo aos vasos e pinealócitos (WURTMANN, AXELROD & KELLY, 1968; VOLLRATH, 1981; MACHADO, 1993). Tendo importante regulação na síntese de melatonina, as terminações nervosas estão bem mais próximas dos vasos que dos pinealócitos, sendo liberados os neurotransmissores, principalmente a norepinefrina ao nível dos espaços perivasculares e daí difundidos até superfície do pinealócito, isto implica que a difusão pelo espaço perivascular é que leva o neurotransmissor até o pinealócito (VOLLRATH, 1985; KLEIN, 1985).

Existem ainda as fibras pinealopetais de origem central, que alcançam a glândula via comissura posterior e habenular. Estas fibras tem origem em diversas regiões do cérebro como os núcleos habenular, paraventricular e supraquiasmático, área pre-óptica, amígdala, centros olfatórios, corpo geniculado lateral e locais de origem das estrias medulares. As fibras pinealopetais contêm peptídeos como a ocitocina, vasopressina, substância P, polipeptídeo intestinal vasoativo e hormônio liberador do hormônio

luteinizante, porém até hoje não foi atribuído uma função significativa a estas fibras de origem central (MOORE, 1996).

Atualmente, com técnicas recentes que utilizam marcadores virais, foi possível identificar fibras de inervação de origem parassimpática oriundas do gânglio esfenopalatino, indo terminar na pineal (LARSEN, ENQUIST & CARD, 1998).

A pineal mostra uma estrutura complexa de tecido conjuntivo, glandular, vasos e nervos. Os tipos celulares principais são os pinealócitos e os astrócitos, podendo ter arranjo folicular com espaços estreitos ou largos. À microscopia óptica os pinealócitos são corados com as mesmas características das demais células nervosas, mostrando um pericario e um sem número de processos citoplasmáticos. O citoplasma contém poucos grânulos que têm atribuída a função de armazenar serotonina para efetuar, posteriormente a conversão em melatonina (VOLLRATH, 1985).

2.3.FISIOLOGIA

2.3.1.- Primeiras observações.

Em 1917, Mc CORD e ALLEN (*apud* AXELROD, 1992), verificaram que o extrato de pineal bovina clareava a coloração da pele de girinos. THIEBLOT em 1947, confirma experimentalmente a ação da secreção da pineal nos órgãos genitais, LERNER em 1955 (AXELROD, 1992; MACHADO, 1993), identificaram este fator com 5-metoxi-N-acetilriptamina. Como o composto clareava a pele dos girinos por agregação dos grânulos de melanina, foi batizada como melatonina.

Foi constatado que o efeito da melatonina era alterar o desenvolvimento gonadal e sua ablação levava a um desenvolvimento acelerado do trato genital (THIEBLOT, 1947), experimentos seguidos com a

administração de melatonina confirmam o seu efeito antigonadotrófico (AXELROD, 1992; MACHADO, 1993).

Em WURTHMAN, AXELROD & CHOU (*apud* AXELROD, 1992), mostraram que a pineal bovina na forma de extrato, diminui o peso dos ovários e a incidência do estro em ratas.

A exposição da rata a períodos de iluminação contínua ou a remoção da pineal, aumenta a incidência do ciclo estral. As ratas expostas a luz, um mês antes da puberdade aumentam o peso do ovário e a frequência do estro (THIEBLOT, 1947; THIEBLOT, BERTHELAY & BLAIRE., 1966; RELKIN, 1967, SORRENTINO et al. 1971). Quando injetadas pequenas doses de melatonina, estas bloqueiam o efeito acima mencionado. A remoção da pineal também aumenta o ciclo estral e injeções frequentes de melatonina inibem resposta à luz em ratas pinealectomizadas, ou seja diminuem o peso dos ovários e o ciclo estral (SIZONENKO et al. 1985).

2.3.2. - Mecanismos de síntese e controle da secreção da melatonina.

A ação da pineal secretando um hormônio que transportado pelo sangue atua em órgãos distantes, classificam-na como glândula e a melatonina em hormônio (AXELROD, 1992). A síntese e a secreção de melatonina são regulados por mecanismos que envolvem o ritmo de luz e escuridão. A luz tem um efeito inibidor na pineal (MACHADO, 1993.). Em peixes, anfíbios e répteis a ação da luz é direta através do crânio ((WURTMANN, AXELROD & KELLY, 1968). Em mamíferos os circuitos envolvidos são iniciados na retina ao nível da camada nuclear externa, deixando a cavidade orbitária via nervo óptico e seguindo até o núcleo supraquiasmático, que recebe a informação diretamente via trato retino-hipotalâmico e indiretamente via trato genículo-hipotalâmico.

O núcleo supraquiasmático é considerado o principal gerador de ritmos no sistema nervoso central, sendo a área que recebe informações e emite

referências para diversos locais onde serão processadas às informações. A forma tridimensional do núcleo supraquiasmático pode variar de acordo com a espécie porém sua simetria bilateral é constante e universal aparecendo nos primeiros vertebrados, e permanece praticamente inalterada ao longo da evolução orgânica das espécies. Está localizado próximo ao III ventrículo, acima do quiasma óptico. Histologicamente não existem diferenças entre seus neurônios com os de outros núcleos vizinhos. Recebe aferências provenientes de vários locais do sistema nervoso central, porém sua aferência principal é o trato é o trato retino-hipotalâmico (TUREK & van CAUTER, 1988; MOORE, 1990, 1992, 1996, 1997; LEANDER, VRANG & MOLLER, 1998). O transmissor que atua na mediação química no **trato retino-hipotalâmico** é o **glutamato**, enquanto no **trato genículo-hipotalâmico** é o **GABA** e o **neuropeptídeo Y**. O núcleo supraquiasmático recebe ainda inervação **serotoninérgica** dos núcleos medianos da rafe e **melatonina** da pineal, que prove o núcleo supraquiasmático de informações rítmicas de origem não fótica (ESBERARD, 1980; NUMAN, 1990; NUMAN & NUMAN, 1991; MACHADO, 1992; AKIYAMA, MORIYA, SHIBATA, 1998). Ainda tem neurônios que utilizam como neurotransmissores o peptídeo intestinal vasoativo, somatostatina e acetilcolina.

Do núcleo supraquiasmático partem fibras simpáticas descendentes que farão sinapse na coluna intermédio lateral da medula cervical baixa e torácica alta, onde estão os neurônios eferentes pré-ganglionares do sistema nervoso simpático. Os axônios dos neurônios simpáticos deixam a medula pelas raízes ventrais e passam ao tronco simpático via ramos ventrais dos nervos espinhais e ramos comunicantes brancos, penetrando no tronco simpático. O tronco simpático é uma cadeia emparelhada de agregados celulares em posição anteromedial da coluna vertebral, com diversas fibras nervosas conectadas em arranjo longitudinal. O gânglio cervical superior está situado na face ventral dos processos transversos das primeiras vértebras cervicais (BRODAL, 1979).

As fibras do gânglio cervical superior, são responsáveis pela inervação de estruturas intracranianas, de pescoço e face. Tem importância endócrina uma vez que vão terminar em órgãos como a **pineal, tireóide e paratireóide, corpos carotídeos, pituitária e eminência média**. A ressecção do gânglio cervical superior, afeta a pineal tendo como consequência a supressão de suas funções (CARDINALI et al. 1997).

Outros efeitos no sistema endocrinológico são vistos como resultado de sua inervação da tireóide e de fibras que vão a nível central pelas projeções ascendentes que emite para a eminência média, tendo então atuação direta nos ciclos reprodutivos uma vez que além da pineal interfere também de modo supressivo no eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. A degeneração Walleriana que se segue a retirada do gânglio cervical superior induz a um aumento temporário da prolactina e ACTH, além de ter efeito depressor sobre o FSH, LH e GH (WURTMANN, AXELROD & KELLY, 1968; CARDINALI & ROMEO, 1990, FORSLING et al. 1993).

A liberação de noradrenalina pelas fibras simpáticas provenientes do GCS, leva a regulação fotoperiódica primária da pineal, agindo ao nível dos adrenoreceptores α_1 e β_1 , aumentando a ativação do AMP cíclico mediado pelos receptores β_1 , potencializando maior fluxo de Ca^{2++} e fosfatidilinositol, e a síntese de prostaglandinas e leucotrienos pela ativação dos receptores α_1 . Fibras pinealopetais podem participar também do controle da secreção da pineal, estas contem vários neuropeptídeos e aminoácidos como o ácido gamaminobutírico (GABA), glutamato e aminas biogénicas como a acetilcolina. Ainda pode existir um controle secundário da pineal mediado via hormônios com os receptores situados ao nível dos pinealócitos ou em outros níveis da via pinealopetal para modular o controle ambiental da secreção de melatonina (CARDINALI, et al., 1987) (Figura 1).

A ação da luz na pineal interferindo na síntese de melatonina é explicada pela estimulação da retina e condução do estímulo pelos tratos retino-hipotalâmico e genículo-hipotalâmico (MOORE, 1992). Estes tratos estimulam o hipotálamo em sua porção mediobasal, sendo sua integridade

fundamental para a transdução do estímulo fótico em endócrino (SORRENTINO, 1971, AXELROD, 1992, MACHADO, 1993, MOORE, 1990, 1992, 1996, 1997). Quando o gânglio cervical superior é removido ou os animais são cegados o efeito da luz na atividade e efeito do estro, é abolida. Isto mostra que a luz diminui a incidência de estro via ação na retina, estimulando as vias adrenérgicas do gânglio cervical superior, que induzem a produção de N-acetil-transferase a ativar a serotonina, que é convertida na N-acetil-serotonina, e esta em melatonina pela HIOMT, posteriormente liberada no sangue e indo atuar nos órgãos alvo (NAMBOODIRI et al., 1984; LIU, B. et al., 1991; VANECEK, 1991; LIU, C. et al., 1997). Por ter estas interações a pineal é considerada como transdutor neuro-endócrino, convertendo impulsos externos em liberação hormonal (AXELROD, 1992).

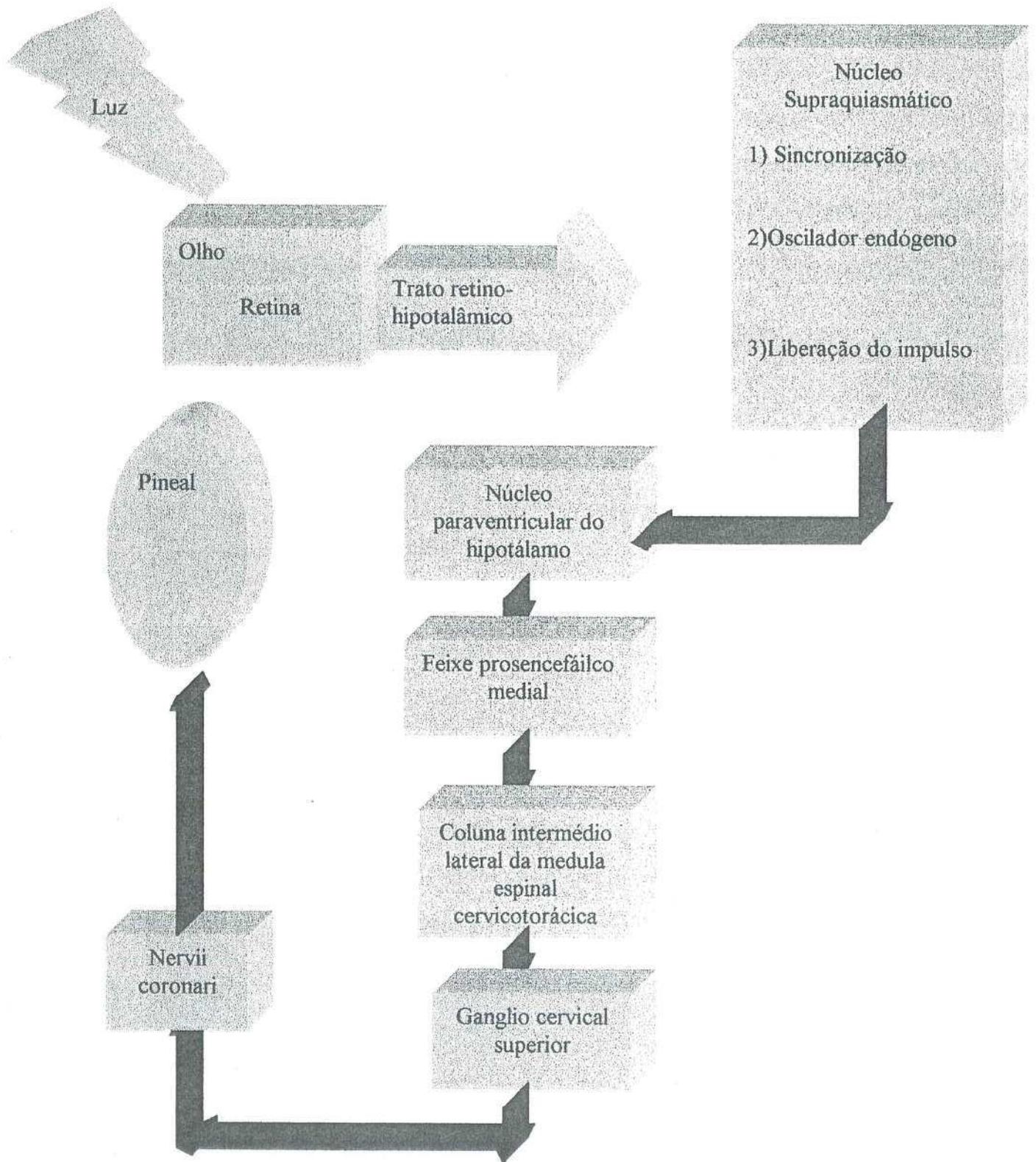


Figura 1. Trajeto da luz até a Pineal.

Os níveis de serotonina em pineal de rato tem seu pico de oscilação ao meio-dia, diminuindo sua concentração durante a noite. O ritmo da serotonina dia/noite permanece constante na escuridão, porém é abolido em ratos sob regime de iluminação constante (AXELROD, 1992). Estes experimentos mostram que o ritmo endógeno de serotonina é circadiano e dependente da luminosidade do meio. Quando ocorre denervação do gânglio cervical superior bilateralmente, também é abolido o ritmo da serotonina. Isto atesta que o ritmo circadiano da serotonina na pineal de rato é gerada por um marca-passo no cérebro, mediada por sincronizadores ligados ao sistema nervoso autônomo (AXELROD, 1992, MOORE, 1996).

O sistema de sincronismo circadiano é um conjunto de estímulos cuja função é a organização temporal dos processos fisiológicos e do comportamento dentro dos padrões circadianos, existindo três componentes principais:

1. Componente visual – Fotorreceptores da retina que emitem vias aferentes: trato retino-hipotalâmico e trato genículo-hipotalâmico.
2. Marca-passos – Geram os sinais do ritmo circadiano, sendo o principal o núcleo supraquiasmático .
3. Vias eferentes primárias – Saem dos marca-passos e vão aos sistemas efetores que exibem a função sincronizadora (MOORE, 1992; MENAKER, MOREIRA & TOSINI, 1997).

O sistema de sincronismo circadiano funciona sob controle de um marca-passo com interligações com diversas vias aferentes e eferentes. As aferentes como o trato retino-hipotalâmico e genículo-hipotalâmico tem atuação de modo distinto ao nível do núcleo supraquiasmático. O trato retino hipotalâmico é o mais importante e termina no núcleo supraquiasmático em sua porção ventrolateral, onde faz sinapses com arranjos assimétricos com os neurônios do núcleo de modo, predominantemente, glomerular. O neurotransmissor envolvido parece ser o glutamato.

O sistema de sincronismo circadiano estabelece uma organização temporal para a regulação homeostática e comportamental, onde permite que expressão do comportamento adaptativo. O núcleo supraquiasmático parece ser o principal marca-passo cerebral, O núcleo supra quiasmático tem duas subdivisões, a ventrolateral que recebe a maioria das fibras do trato retino hipotalâmico e tem como característica ter neurônios que contém peptídeo intestinal vasoativo e uma porção dorsomedial que recebe fibras esparsas proveniente da retina e contém neuronios produtores de vasopressina. Por ter como principal neurotransmissor o GABA, infere-se que a ação do núcleo supraquiasmático seja inibitória. As principais eferências do núcleo supraquiasmático são para a região anterior do hipotálamo, na região conhecida como zona supraventricular. Existem outras conexões do núcleo supraquiasmático com diversas áreas do hipotálamo que vão ligar o diencéfalo e o sistema nervoso autônomo com as reações de sincronismo e ritmos circadianos (MOORE, 1992; REITER, R.J., 1993, 1995; MOORE, 1996; HILL et al., 1996). As correlações entre a pineal e os neurotransmissores hipotalâmicos é complexa e envolve várias vias dentro hipotálamo conectando o sincronismo ambiental com o hormonal, traduzindo o fotoperíodo em resposta hormonal (VANECEK, 1991). O sítio de ação da melatonina abrange o hipotálamo e a hipófise anterior, ao nível celular atua na membrana plasmática com receptores específicos para sua ligação inibindo o acúmulo de AMP cíclico e GMP cíclico, assim como a síntese de diacilglicerol e a liberação de ácido aracdônico ao nível da fenda sináptica (Figuras 2 e 3).

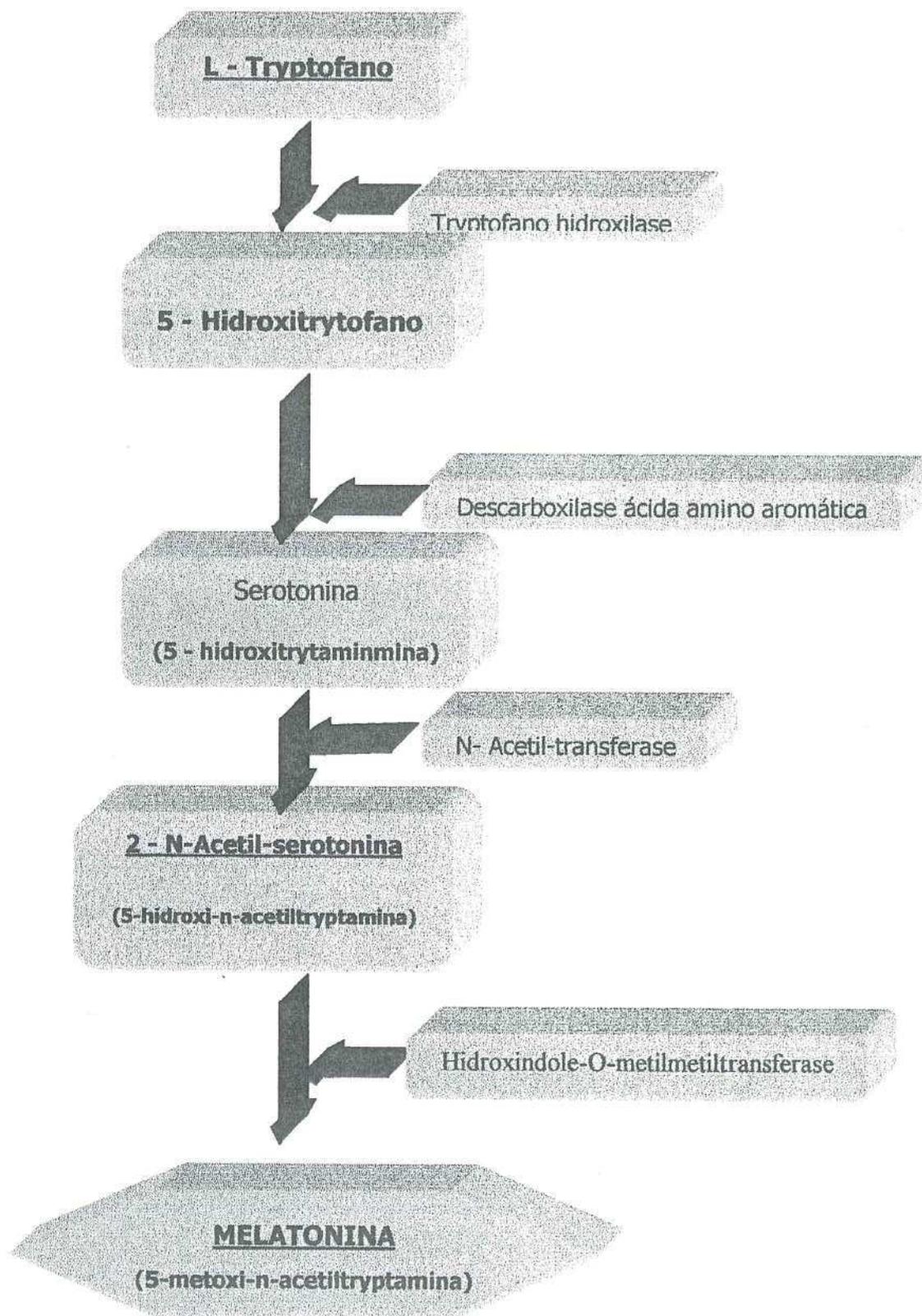


Figura 2 Figura 2. Síntese da melatonina.

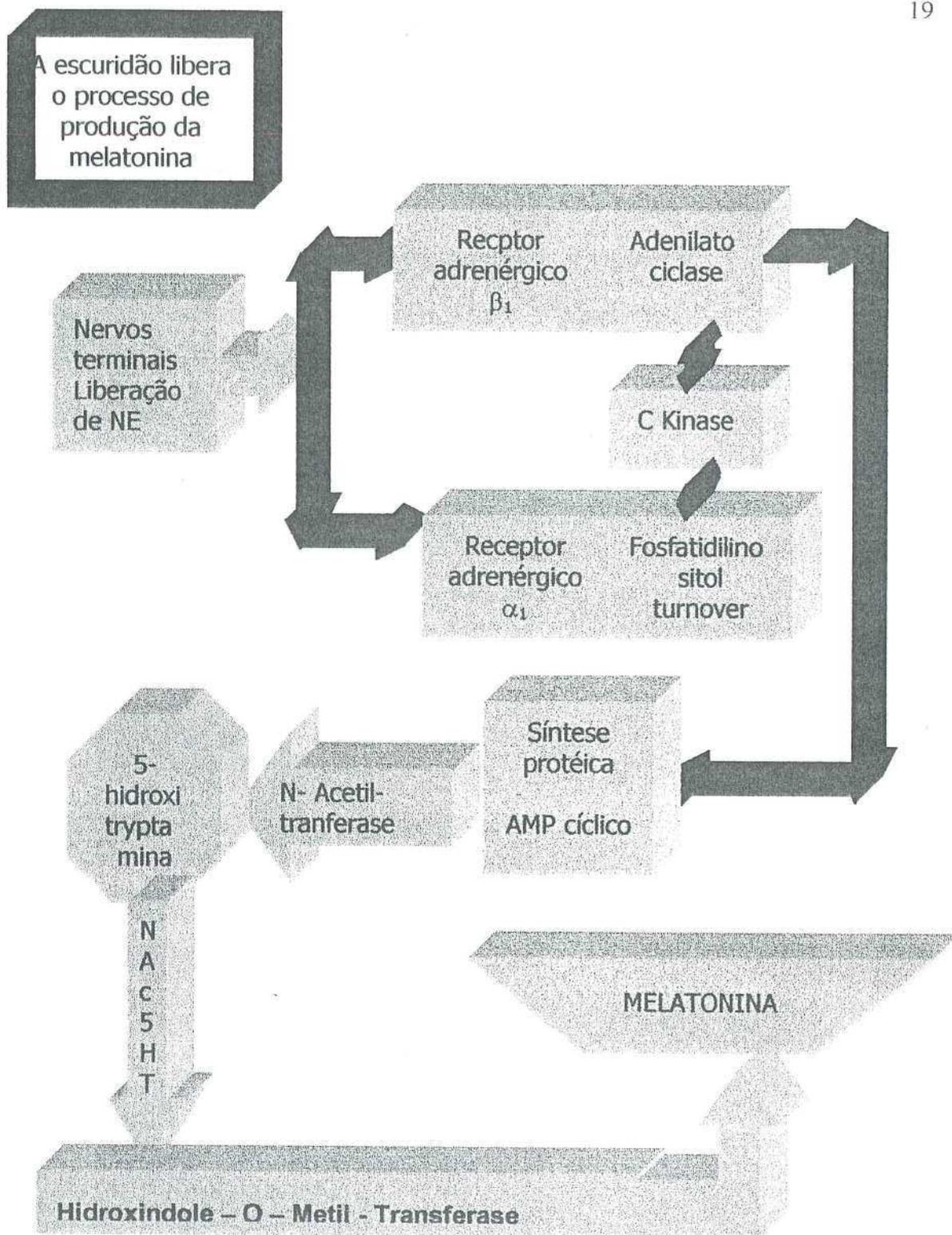


Figura 3. Síntese da melatonina após exposição a escuridão.

2.3. 3 - Pineal e Reprodução.

O efeito antigonadotrófico da melatonina, sobre as gônadas é sabido desde os primeiros experimentos sobre a pineal. Ao longo dos anos tem sido procurado o modelo fisiológico que explique as interligações complexas entre os ritmos biológicos e a sincronização exercida pela luz no núcleo supraquiasmático em todos os vertebrados, não somente no âmbito de ritmo diário (circadiano), mas também quanto aos ritmos semanais (circaseptano), mensais (circatrigitano) e anuais (circanual). A fertilidade o comportamento reprodutivo e o comportamento materno são intrinsecamente ligados aos períodos da natureza e o animal deve ser informado de qual é a época certa para o acasalamento e a reprodução (WURTMAN, AXELROD & KELLY, 1968; TUREK & van CAUTER, 1988; BINKLEY, 1993; REITER, R.J., 1993, 1995; REUSS, 1996; HILL, 1996; SHEPHARD & SHEK, 1997; WALLEN, E.P., 1987; VUILLEZ, P. et al., 1998) .

O eixo hipotálamo-hipofisário tem fundamental importância no que se refere a regulação das funções reprodutivas. O hipotálamo recebe conexões de todo o encéfalo e tem estreita ligação com a vida vegetativa, é uma estrutura que pouco se alterou ao longo da evolução dos mamíferos e daí a sua ligação com o sistema límbico e a reprodução (BONNEFOND et al., 1989, MOORE, 1990, 1992, 1996, 1997)

Os neurônios do hipotálamo que tem maior importância do ponto de vista neurosecretor são sistemas magnocelular e parvocelular. O sistema parvocelular secreta hormônios para circulação porta da hipófise de onde irão estimular a síntese de gonadotrofinas. O sistema parvocelular emite eferentes para a área mediobasilar do hipotálamo. Ao sistema parvocelular estão ligados os sistemas de produção do hormônio secretor de gonadotrofinas e o sistema tubero-hipofisário de neurônios dopaminérgicos. O transdutor hipotalâmico localizado ao nível de sua porção mediobasal integra os fatores neurais e hormonais e traduz em um sinal oscilatório que finalmente resulta na liberação

do hormônio secretor de gonadotrofinas, que irá modular a liberação de gonadotrofinas pela hipófise.

A melatonina atua nas funções cíclicas do eixo hipotálamo-hipofisário-gônadas, modificando a frequência de liberação do hormônio secretor de gonadotrofinas hipotalâmico. Assim a pineal atua como modulador dos mecanismos sincronizadores dos ciclos hormonais (MOORE, 1990, 1992, ;SANDYK, 1992; FORSELING et al., 1993; GAUER, MASSON-PEVET & PEVET, 1993; MASSON-PEVET, BIANCHI & PEVET, 1996; MOORE, 1996, 1997).

Nas fêmeas de mamíferos temos 2 tipos de ciclos reprodutivos: o ciclo estral e menstrual. Os ciclos estrais são próprio dos mamíferos inferiores, o ciclo menstrual é característico apenas dos primatas (YEN, 1990).

O ciclo estral é múltiplo (poliestral) em roedores, sendo interrompido apenas na gravidez. No rato o ciclo estral dura em torno de 4 a 5 dias e na noite do proestro ocorre a ovulação, fenômeno dependente dos níveis de hormônio luteinizante. A onda de hormônio luteinizante que resulta na ovulação é dependente dos sistemas neuronais hipotalâmicos, que por sua vez são regulados pelos mecanismos endógenos geradores de ritmos circadianos, principalmente os do núcleo supraquiasmático. Quando o núcleo supraquiasmático é lesado as ratas entram em estro constante, ou seja, a rata exhibe estro vaginal contínuo sem evidencia de ciclo estral, resultando animais estéreis e não copulantes. A lesão do núcleo supraquiasmático leva a perda dos ritmos circadianos (MOORE, 1990, YEN, 1990, MOORE, 1996, 1997).

O ritmo claro-escuro também tem influência no desenvolvimento das crias. Nos mamíferos altriciais o reconhecimento da sazonalidade e dos períodos do meio ambiente, é de fundamental importância para a sobrevivência da cria (BRONSON, 1988).

A função de sincronização permite ao animal antecipar mudanças sazonais e regular a época do comportamento reprodutivo (HASTINGS et al., 1985).

O núcleo supraquiasmático materno regula o sincronismo circadiano fetal, uma vez que seu núcleo supraquiasmático ainda é imaturo (REPPERT, DUNCAN & GOLDMAN, 1985; ZITOUNI, PEVET & MASSON-PEVET, 1996; NAITOH et al., 1998).

Existem evidências de que a sincronia mediada pelo sistema nervoso materno é controlada pelo núcleo supraquiasmático e levada até o feto pelas vias simpáticas fazendo conexão com as inervação simpática da placenta (REPPERT, DUNCAN & GOLDMAN, 1985).

A melatonina materna parece ser um dos principais mediadores da ritmicidade no ciclo fetal. Já que atravessa facilmente a barreira placentária e assim pode chegar até o feto e sincronizar os ritmos fetais, por provável atuação a nível hipotalâmico informando as fases do ritmo claro-escuro. Outros hormônios, principalmente a prolactina e a cortisona maternas, também contribuem para a organização temporal dos ritmos fetais (SIZONENKO et al., 1985; DIAZ, et al., 1995; FERNANDEZ, et al., 1995; ZITOUNI, PEVET, MASSON-PEVET, 1996).

A sincronização dos ritmos dependente da mãe continua até o período pós-natal. O núcleo supraquiasmático é fundamental para a sincronização do feto, implicando que lesões aí alteram a sincronização tanto na fase de vida intra e extra-uterina (REPPERT, DUNCAN & GOLDMAN, 1985; HASTINGS et al., 1985; KLEIN, 1985)

Outros componentes que também concorrem para o sincronismo fetal são gerados pelo próprio comportamento materno tais como o ritmo de atividade e descanso, o ritmo alimentar; substâncias como glicose e aminoácidos, além de hormônios intestinais e em e fatores ambientais que incluem a oscilação da temperatura ao longo do dia, ritmo alimentar.

No rato, a mielinização das vias do trato retino-hipotalâmico vão iniciar a inervação do núcleo supraquiasmático a partir do 4^o dia de vida pós-natal. No 6^o dia a retina já pode influenciar a sincronização da cria e a partir daí seu organismo irá progressivamente assumindo o controle de seu ritmo circadiano.

A duração do ritmo claro-escuro influencia a maturação sexual das crias em várias espécies, (KLEIN, 1985; REPERT, DUNCAN & GOLDMAN, 1985; SIZONENKO et al. 1985; NAITOH et al., 1998).

Após o parto, será iniciado um novo período de comportamento especial relativo aos cuidados com a cria, incluído entre estes cuidados, está a amamentação (GUYTON, 1976; YEN, 1990). O processo de lactação não incluirá só os cuidados parentais mas também a produção de leite, que é indispensável para a preservação das espécies mamíferas (YEN, 1990).

Para a lactação concorrem dois processos: A produção de leite e a ejeção do leite dos reservatórios da glândula mamária. A produção do leite se deve principalmente à prolactina. A prolactina é produzida na hipófise em células conhecidas como lactotrofos (YEN, 1990). Os níveis de prolactina são regulados pelos níveis de dopamina no hipotálamo, além de outros hormônios (YEN, 1990).

Durante a lactação os níveis de prolactina estão um pouco acima do normal, sendo mantido por pulsos de liberação, estimulados pela sucção. Lesões na medula ou em qualquer outra parte que interrompam o componente aferente eliminam a resposta do reflexo ejecto-lácteo (YEN, 1990).

Apesar de ser secretado no interior dos alvéolos mamários o leite não escoará livremente, é necessário que ele seja ejetado, o que ocorre através do mecanismo ejecto-lácteo. Este processo complexo é controlado por uma combinação de reflexos neurogênicos e secreções humorais, integrando a ação no sistema nervoso a nível hipotalâmico. A liberação do leite do reservatório da glândula mamária se faz por um mecanismo reflexo, o reflexo ejecto-lácteo. O controle neuroendócrino se dá por três fatores:

- A)** Liberação de ocitocina a partir de estímulos luminosos aferentes (provocados pela visão da cria), que chegam aos núcleos supra-óptico e paraventricular e estimulam a liberação da neurosecreção. O hormônio entra na corrente sangüínea e chega até a glândula mamária onde estimulará a contração das células

mioepiteliais nos alvéolos e ductos mamários, o que causará a ejeção do leite.

- B) A ocitocina também pode ser liberada por ações comportamentais como o ato de brincar com a prole.
- C) Ao ser iniciada a sucção, o estímulo de terminações nervosas do mamilo ascendem até o hipotálamo, aos núcleos supra-ópticos e paraventricular, estimulando os neurônios a liberar ocitocina. No período de lactação, a sucção e os níveis de estrogênio levam à supressão da síntese de dopamina com a conseqüente liberação da produção de prolactina (GUITON, 1976; WAKERLEY, CLARKE; SUMMERLEE, 1988; McNEILLY, 1988 ; YEN, 1990).

Estudos mostram que a prolactina tem sua maior concentração durante o sono noturno, iniciando-se lentamente em 10 a 60 minutos, com uma série posterior de picos que ocorrerão em torno de 3 a 8 pulsos, mantendo a concentração plasmática elevada durante a noite (YEN, 1990). Outros fatores também estão associados ao aumento da prolactina durante o período de 24 horas, como estresse, exercícios e ingesta de alimentos ricos em carboidratos e proteínas (YEN, 1990).

Pode-se concluir, portanto que o processo de lactação, tem seu ritmo que pode ser influenciado pela luz diretamente, ou mediada pela melatonina.

2.3. 4 – Ritmos circadianos e comportamento reprodutivo.

A seleção natural assegura que a reprodução vá ocorrer em harmonia com o meio. Os organismos superiores visando este fim desenvolveram

sistemas sinalizadores e receptores com a função de perceber às variações do meio e poder reagir com a resposta neuroendócrina mais adequada.

Na natureza os processos reprodutivos são limitados por fatores externos que obrigam o animal a se adaptar para tentar minimizar o impacto de fases ruins e tirar proveito das fases boas. Os períodos de seca ou de chuvas copiosas, variações de temperatura e umidade, levam a alterar a disponibilidade de comida em toda cadeia alimentar, e a disponibilidade de alimento interfere diretamente no comportamento reprodutivo. A demanda energética para a estabilidade homeostática compete com o comportamento reprodutivo pelas calorias necessárias disponíveis (BRONSON 1988)..

Alguns mamíferos se adaptaram aos ciclos sazonais para poderem se ajustar às alterações metabólicas impostas pelo meio e assim obterem a melhor performance reprodutiva em épocas favoráveis, reconhecendo os fotoperíodos e os ciclos da natureza (BRONSON, 1988; TUREK & van CAUTER, 1988). A predição sazonal permite uma preparação metabólica para o período vindiouro baseada na disponibilidade de água e a quantidade de comida (BRONSON, 1988; TUREK & van CAUTER, 1988). Esta atitude combinando fatores endógenos de adaptação orgânica e antecipação de fases, maximiza a probabilidade de sucesso reprodutivo entre as espécies. Isto é um grande avanço evolutivo quando as variações climáticas podem ser previstas e quantidade de comida é acertada, uma vez que o único fator certo no meio ambiente é o fotoperíodo (ritmo claro-escuro). (BRONSON, 1988; TUREK & van CAUTER, 1988; CURLEWIS, 1992).

A regulação fotoperiódica da reprodução é somente uma parte da cascata de sincronização que as variações sazonais exigem dos organismos. A regulação social é um fator importante e deve ser levado em conta. O modo como a vida em comunidade interfere está ligado ao fatores hormonais e sociais. Grupos de indivíduos trocam entre si informações subliminares via ferormônios, que dentre outras funções auxiliam o controle da ovulação, os ferormônios têm ação reguladora na maturação sexual de indivíduos, um exemplo deste controle é que eles podem atrasar ou acelerar a ovulação das

fêmeas jovens dependendo de seu número. Situações sociais de conflito, quando um grupo alcança altas taxas populacionais em ambientes restritos, evocam respostas de agressividade e estresse, levando a um efeito inibidor na reprodução via hormônios do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal e hipotálamo-hipofisário-gonadal (BRONSON, 1988; TUREK & van CAUTER, 1988; JUSZCZAK, 1998).

A medida que o volume do corpo aumenta também aumenta a demanda de energia e com isto a necessidade de mais alimentos. Os mamíferos maiores tenderão a ter períodos de vida maior e à medida que aumentam de tamanho os animais também deixarão de ser tão dependentes dos ritmos circadianos, tendo a atenção voltada para uma busca de alimento constante e tenderão ainda a ter menor número de filhotes em intervalos maiores.

A restrição de alimento diminui os níveis de hormônio luteinizante, hormônio tireoestimulante, hormônio do crescimento e prolactina, dentre outros, via diminuição de hormônio secretor de gonadotrofinas e prolactina ao nível do hipotálamo e hipófise anterior. (BRONSON, 1988; TUREK & VAN CAUTER, 1988).

A correlação destes fatos ligados a baixa ingestão calórica e fotoperíodos é lembrada uma vez quando correlacionam estes hormônios com a via óptica, pineal, melatonina e hormônio secretor de gonadotrofinas (BRONSON, 1988; TUREK & van CAUTER, 1988; CURLEWIS, 1992; KALSBECK et al., 1996; JUSZCZAK, 1998;).

O estresse é também um fator de diminuição e interferência nos hormônios secretados pelo eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal e hipotálamo-hipofisário-gonadal, inibindo também a resposta da hipófise ao hormônio secretor de gonadotrofinas e diminuindo os esteróides sexuais (sexuais) (YEN, 1990; SHEPHARD & SHEK, 1997; CHIODERA, et al., 1998. DAWNSON & van den HEUVEL, 1998; JUSZCZAK, 1998)..

Os fatores externos que regulam o comportamento reprodutivo são múltiplos, destes, o controle do ritmo claro-escuro é fundamental e o mais

evidente, porém a disponibilidade de alimento, a temperatura e o estresse, são também ritmos reguladores do comportamento reprodutivo (FACTOR, MAYER & ROSENBLATT, 1993; SHEPHARD & SHEK, 1997; JUSZCZAK, 1998).

O comportamento reprodutivo depende da organização temporal destes processos, sejam eles endógenos ou exógenos. O ritmo hormonal é considerado ultra-radiano, ou seja é um período de tempo menor que 01 dia (24 horas), sendo variável conforme cada hormônio e seu fator estimulante, tendo um encadeamento em sua secreção, sendo necessário um padrão específico para seu funcionamento correto na cadeia hormonal. O sistema nervoso parece ser a fonte controladora dos ritmos ultra-radianos, pelas ligações dos eixos hipotálmo-hipofisário-adrenal e hipotálmo-hipofisário-gonadal, com atividades estimuladoras e inibidoras. A nível hipotalâmico o núcleo arqueado parece ser o sítio de controle (TUREK & VAN CAUTER, 1988).

Existem ainda ritmos ligados ao sono e liberação de pulsos de hormônios, também ligado ao eixo hipotálmo-hipofisário-adrenal e hipotálmo-hipofisário-gonadal ligado ao sono REN e não REN. Hormônio luteinizante, testosterona, melatonina e prolactina têm maior liberação durante o sono e à noite (YEN, 1990; KENNAWAY, 1997; LEANDER, VRANG & MOLLER, 1998).

A sincronização é fundamental para o exercício correto das funções vitais e os padrões de comportamento adequados ao meio e à necessidade individual.

O ritmo circanual interfere em atividade mais amplas como a locomotora, início da puberdade, início de atividade glandular, sendo ativados ou inibidos pelo fotoperíodo da luz ao longo do ano, assim os ritmos são regulados pelo ritmo claro-escuro pela via neural e sustentados pelas resposta hormonais (TUREK & van CAUTER, 1988; BINKLEY, 1993).

3. MATERIAL E METODOLOGIA

3. MATERIAL E METODOLOGIA

3.1 - Material

Foram usados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, BERKENHOUT, 1769), com 90 a 120 dias de vida, obtidos em amostragem aleatória simples na colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF. As fêmeas eram nuligestas e os machos tiveram sua fertilidade comprovada previamente (inseminação com gestação positiva).

3.2 - Condições de criação e manutenção dos animais

O alojamento de ratos, no Biotério do Centro de Biologia da Reprodução – UFJF, é provido de amplos basculantes telados e de dois exaustores, além de aquecedores de meio ambiente. A temperatura é mantida ao redor de 22C⁰, pela ventilação natural no verão e, no inverno, com ajuda de aquecedores. A iluminação é mista – luz natural e lâmpadas incandescentes – sendo as últimas controladas para acenderem automaticamente às 6hs e apagarem às 18hs. Os animais são mantidos em gaiolas de polipropileno, providas de camas de maravalha, mamadeira para água filtrada para consumo *ad libitum* e cocho para ração peletizada específica para ratos e camundongos de laboratório. Em média, cada rato recebe cerca de 15g de ração por dia (PETERS & GUERRA, 1996). Tomando-se como media o consumo habitual de 12g de ração por indivíduo adulto não gestante (PETERS & GUERRA, 1996), todos os dias às 11hs eram pesados 30g de ração e colocadas em cada gaiola. Tal procedimento foi seguindo desde o nascimento até o 10^o dia de vida. Desta data até o desmame, foram colocadas diariamente 50g de ração por gaiola e o consumo de ração passou a ser considerado como o consumo da “família”.

A temperatura do alojamento onde se realizou o experimento foi tomada diariamente. O controle da temperatura dos alojamentos foi feita conforme a rotina do Biotério do CBR/UFJF (PETRS & GUERRA, 1996).

O sistema de acasalamento é do tipo poligâmico, na proporção de 4 fêmeas para 1 macho, e o dia de inseminação é determinado pelo encontro de espermatozoides no esfregaço vaginal.

3. 3 - Desenho experimental

3. 3.1 - Organização dos grupos experimentais

Foram constituídos por lotes de 10 fêmeas, inseminadas e distribuídas aleatoriamente para os seguintes procedimentos:

- I. Grupo controle da colônia (CC).
- II. Grupo pinealectomizado (XPNT).
- III. Grupo de operação simulada de pinealectomia (SPNT).
- IV. Grupo com o nervo óptico seccionado (XNO).
- V. Grupo de operação simulada de secção de nervo óptico (SXNO).
- VI. Grupo de pinealectomia mais secção de nervo óptico (XPNT+NO).
- VII. Grupo de operação simulada de pinealectomia mais secção de nervo óptico (SPNT+NO).
- VIII. Grupo exposto a luz constante.

3. 3.2. - Procedimento cirúrgico

As fêmeas foram operadas aos 20 dias depois da inseminação, visando diminuir o efeito do estresse cirúrgico sobre o processo natural do trabalho de parto, previsto em torno do 21^o – 22^o (PETERS & GUERRA, 1996).

3. 3.2.1 - Anestesia

As cirurgias foram realizadas sob anestesia inalatória com éter etílico (COHEN & DRIPPS, 1967; DRIPPS, 1967; PRICE & DRIPPS, 1967; WAYNFORTH, 1980), utilizando-se uma ampola, confeccionada a partir de vasilhame plástico baseado no método de anestesia inalatória gôta-à-gôta (WOLLMAN & DRIPPS, 1965). O princípio de seu funcionamento é a inalação de uma mistura do anestésico com o ar ambiente, sendo que a medida do necessário se goteja mais éter para aumentar a concentração e aprofundar o plano anestésico. Tal processo evita a dor e aumenta o relaxamento do animal, atos necessários para diminuir a mortalidade per operatória, decorrente da toxicidade do éter e para serem respeitadas as normas de ética de experimentação animal.

O animal era observado quanto ao plano ideal de anestesia baseados nos critérios de GUEDEL (DRIPPS, 1965), aplicados à observação no rato:

Ritmo cardíaco e respiratório - sinais de taquipnéia e taquicardia indicaram que o animal estava entrando no plano anestésico profundo, podendo ser submetido ao procedimento cirúrgico. **Aspecto da coloração das extremidades** - O aspecto róseo da pele das extremidades das patas avalia clinicamente, sem o uso de monitores a saturação de O₂, considerando a cianose um sinal de baixa saturação.

3. 3.2.2 - Técnica Operatória

Secção de nervo óptico:

O animal é posicionado em decúbito ventral, sob anestesia geral inalatória com éter etílico (PRICE & DRIPPS, 1965), com a cabeça posicionada dentro da ampola. Com a verificação clínica que o animal está anestesiado é realizada assepsia e anti-sepsia dos pêlos da cabeça com Polivinilpirrolidona-

iodo, lauril-éster, sulfato de sódio (PVPI) degermante, e colocados campos estéreis.

A incisão é feita na linha média, sob magnificação de 2,5 X usando uma lupa cirúrgica marca Eschenbach ®, partindo da base do nariz até aproximadamente a metade da distância entre as duas cavidades orbitárias (Figura 4). Inicia-se a dissecação descolando-se primeiro a pele do pericrânio até a borda lateral superior da cavidade orbitária, identificando-se o ramo oftálmico do trigêmeo e uma pequena veia que corre paralela a este, devendo evitar o seu rompimento (Figura 5). Disseca-se o tecido conjuntivo retrobulbar com uma tesoura de Íris e um gancho de nervo, criando-se um plano de clivagem, que permite dissecar a musculatura ocular extrínseca e identificar o nervo óptico (Figuras 6 e 7). O nervo após sua identificação é isolado e tracionado pelo gancho e então seccionado com a tesoura ou uma lâmina de bisturi no 11 (Figuras 8, 9 e 10). A hemostasia é realizada com compressas de gaze ou algodão umedecido em soro fisiológico a 0,9% (Figura 11).

A sutura é feita em plano único com pontos contínuos usando fio absorvível, Vicryl ® nº 4-0 com agulha cilíndrica.

Pinelectomia (Modificado de HOFFMAN & REITER, 1965 e WAYNFORTH, 1980).

Com o animal anestesiado, em decúbito ventral e com a cabeça apoiada na garrafa plástica, era feita incisão linear mediana sob magnificação de 2,5 X com uma lupa marca ESCHENBACH ®, da altura dos olhos até o tecido conjuntivo e muscular localizado na altura do forame magno, interessando todos os planos do escalpo (Figura 12). O local da craniotomia é identificado a partir da localização da confluência dos seios sagital e transversos e visualizado seu sitio através da transparência óssea.

A craniotomia é realizada com uma trefina de 4,5mm feita especificamente para este fim, logo acima do ponto identificado no ângulo da confluência dos seios, deve-se procurar manter preservada a integridade da

dura-máter, a fim de evitar sangramentos excessivos. A dura-máter é apreendida com uma pinça de relojoeiro e incisada com uma lamina de bisturi nº 11 utilizado em microcirurgia para abertura de aracnóide, sendo levantada e separada lateralmente (Figuras 13). A hemostasia foi realizada com algodão estéril umedecido em soro fisiológico e água oxigenada a 20 vols. em proporções iguais, ou cera de osso (CIRUMÉDICA ®) (Figura 14). Cada pineal após sua localização entre os hemisférios cerebrais e o vérmix cerebelar, foi retirada com uma microcureta de hipófise, sendo feita nova hemostasia pôr compressão leve com algodão no leito vazio, até cessar completamente o sangramento (Figura. 15). Não foi colocado novamente o retalho ósseo e a sutura foi feita em plano único contínua, com VICRYL ® 4-0 com agulha atraumática. Sendo feito curativo com PVPI nos dois dias seguintes a cirurgia (Figura16).

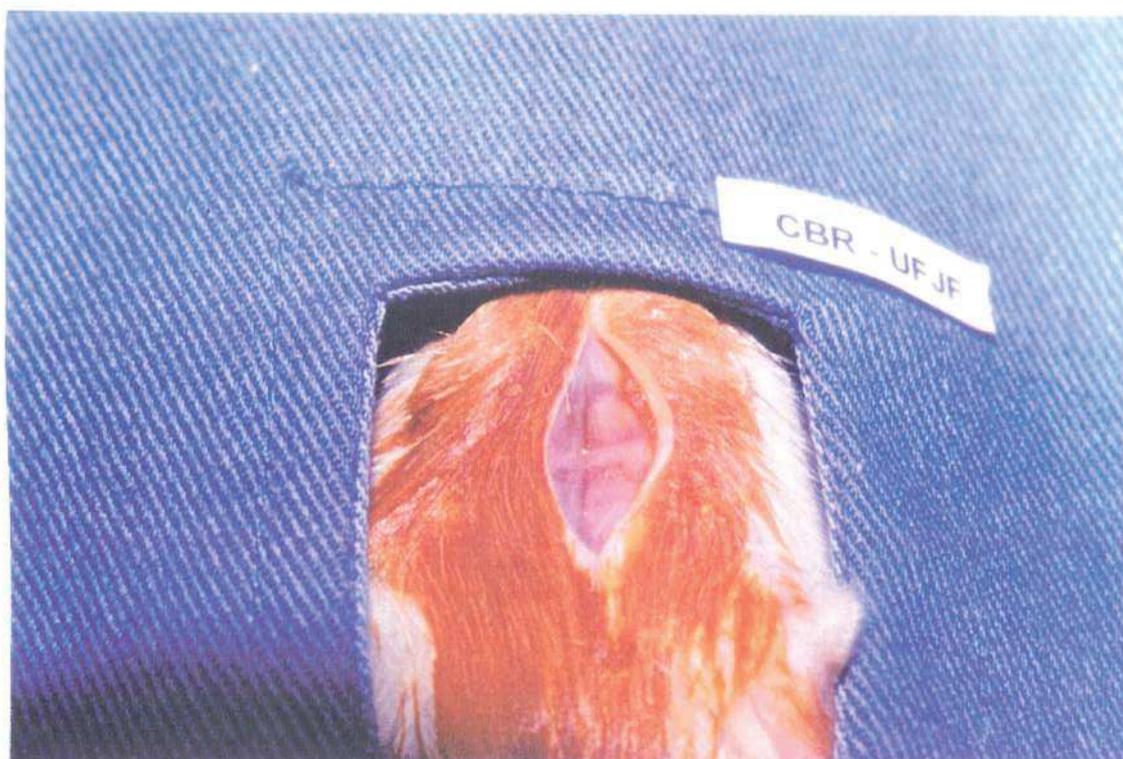


Figura 4. Incisão no escalpo, na linha média, entre os globos oculares.



Figura 5. Dissecção do pericrânio, com seu descolamento até o rebordo orbitário, identificando os planos de clivagem do globo ocular.

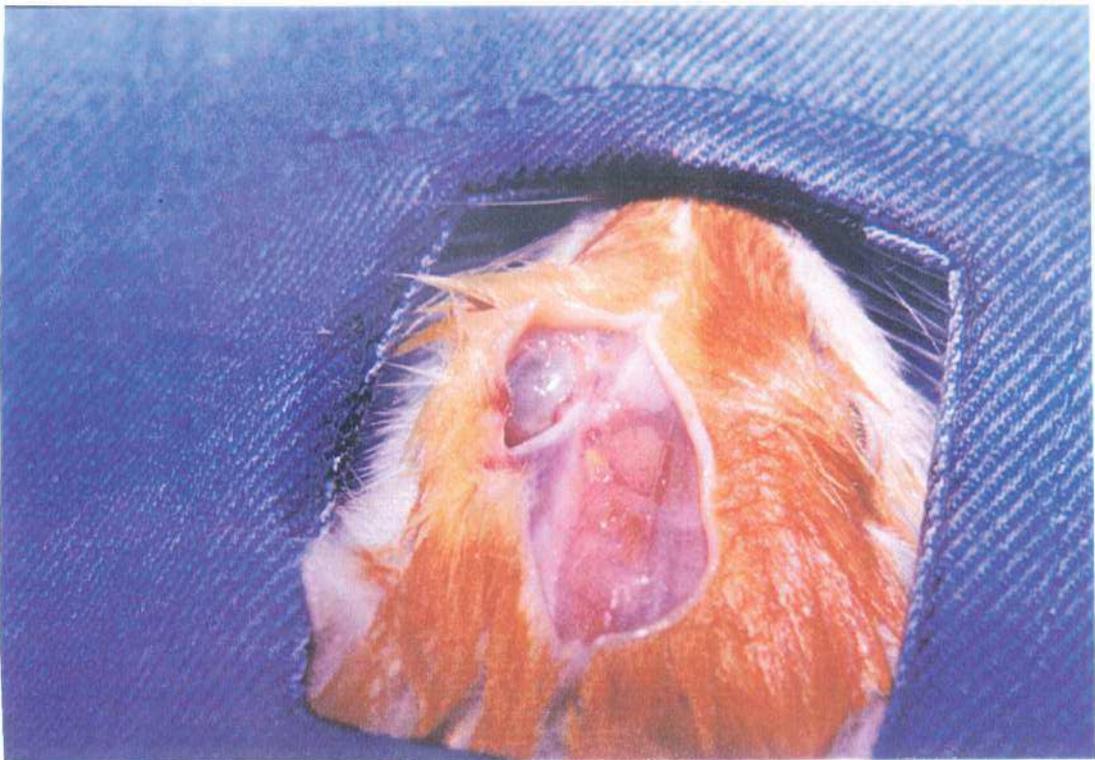


Figura 6. Divulsão dos planos dos tecidos orbitários.



Figura 7. Divulsão dos planos dos tecidos orbitários, no gancho de nervo estão ainda englobados músculos retrobulbares e o n. óptico(seta)



Figura 8. Identificação do nervo óptico. As estruturas retrobulbares são identificadas e separadas a fim de individualizar o n. óptico (seta).

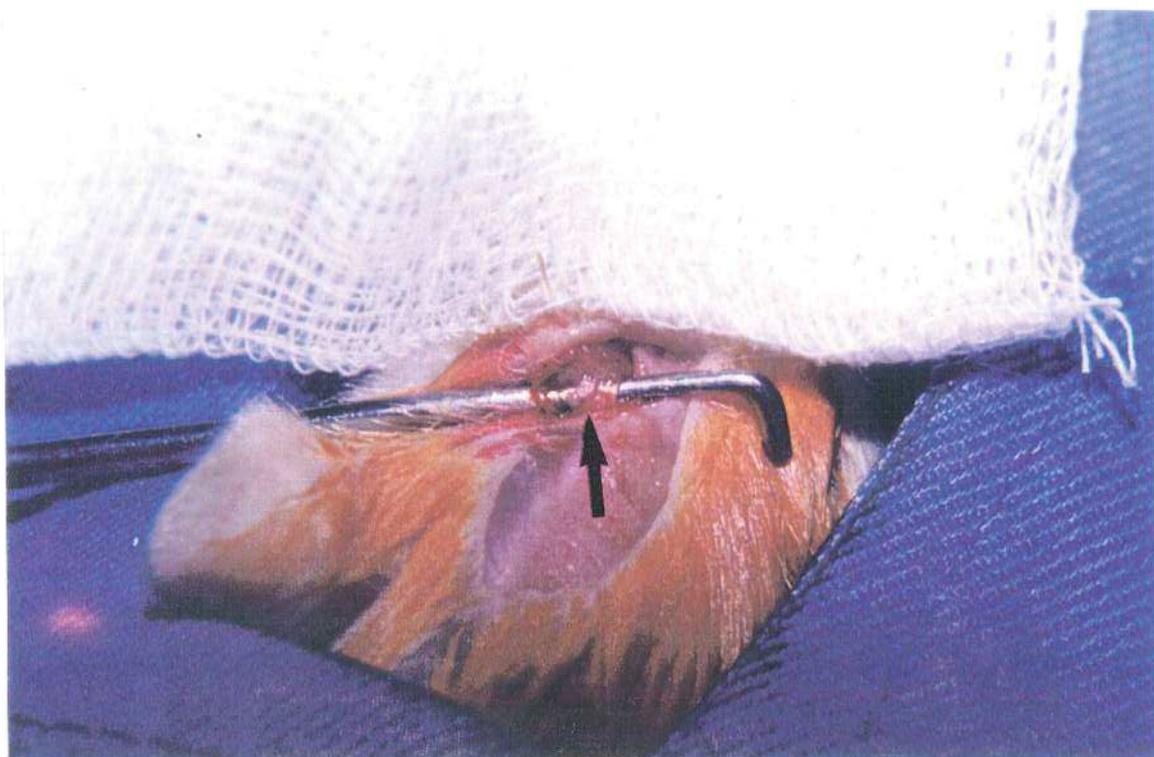


Figura 9. Nervo óptico identificado e parcialmente seccionado (seta).

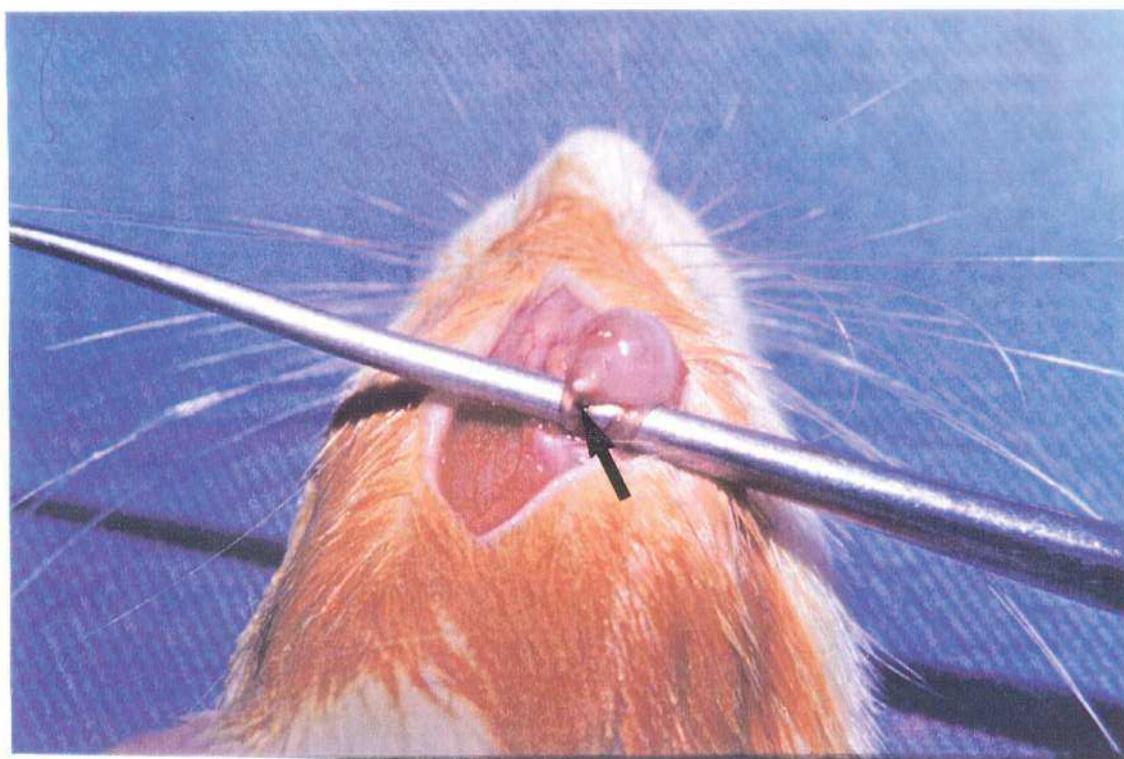


Figura 10. Nervio óptico seccionado (seta).



Figura 11. Hemostasia por irrigação e compressão, após a secção do nervo óptico.

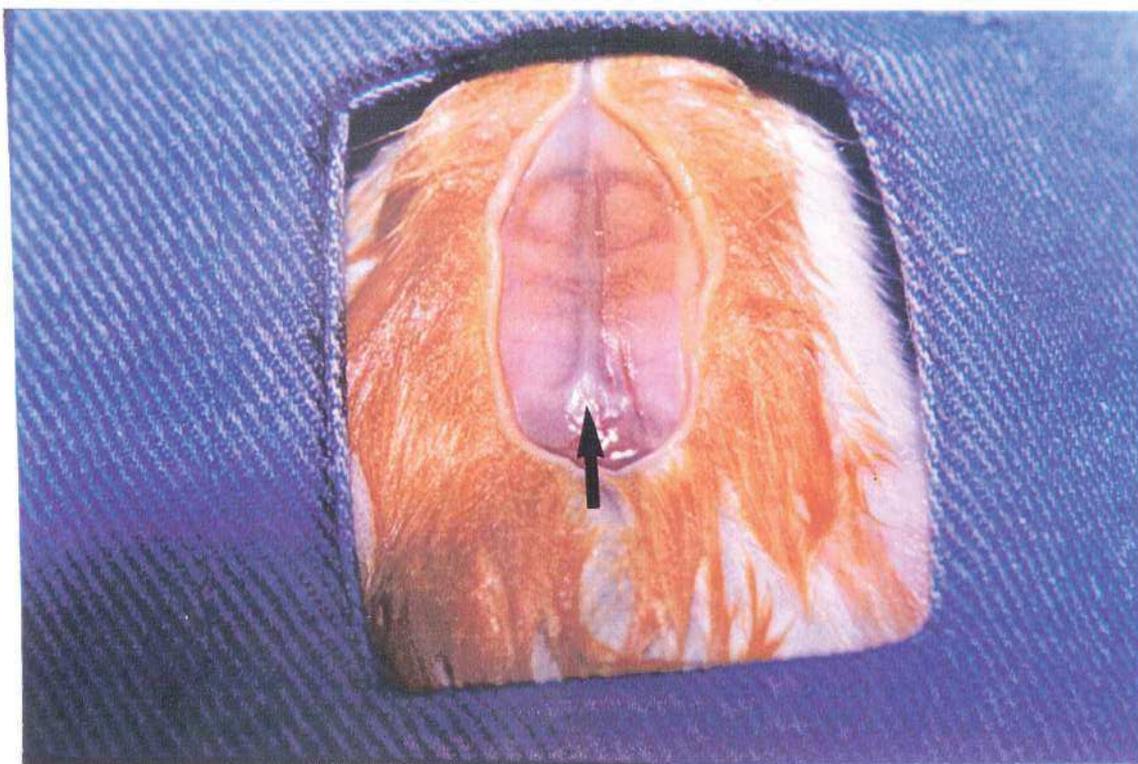


Figura 12. Incisão para a pinealectomia. A confluência dos seios, deve ser visualizada com clareza, a pineal se localiza no angulo formado pela junção dos seios transversos, logo abaixo da calota craniana (seta).



Figura 13. Trepanação acima da localização da pineal.

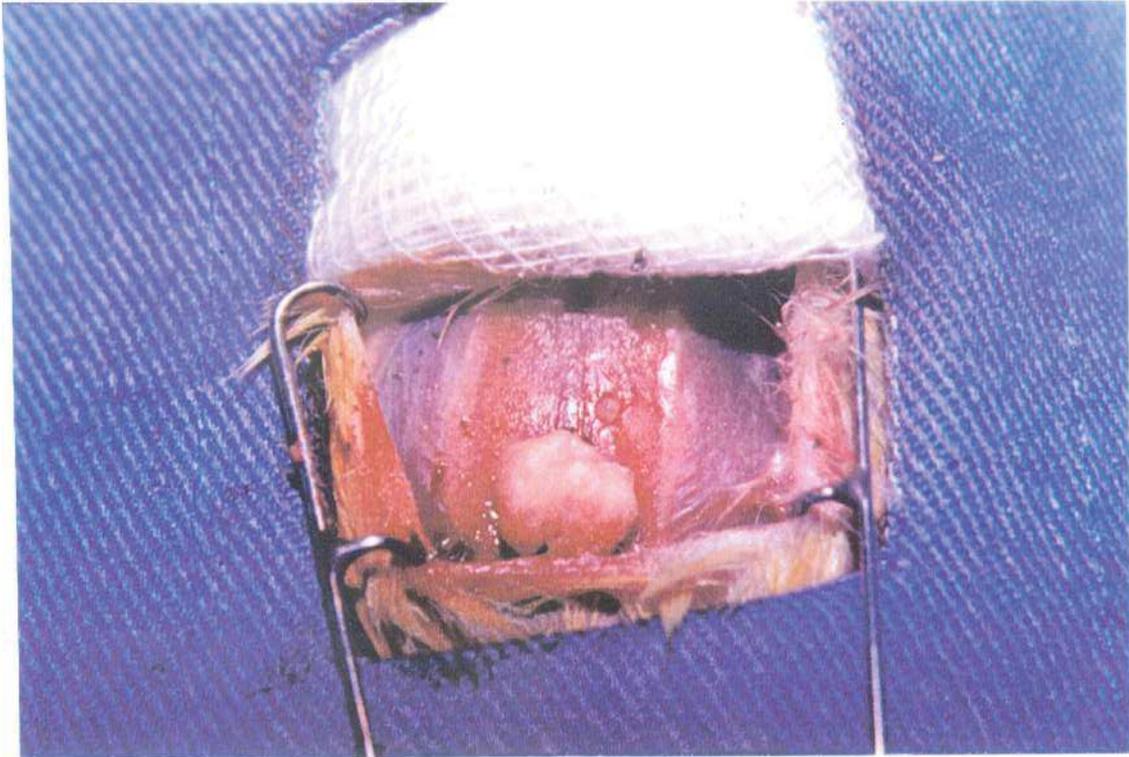


Figura 14. Hemostasia com algodão e soro fisiológico.



Figura 15. Pineal removida e leito cirúrgico sem sangramento.

Subseqüentemente à cirurgia o animal foi observado quanto à presença de infecção e sinais de instabilidade orgânica.

Operações simuladas.

As operações simuladas repetem os mesmos passos porém não ocorre a secção do nervo óptico nem a remoção da pineal. O objetivo é o controle do estresse ao que cada grupo foi submetido e sua influência nas alterações dos resultados obtidos.

3.3.3 - Observações pós-operatórias

Cada animal depois de submetido à cirurgia, foi deixado em gaiola individual, com livre acesso à água e alimentação e foi observado quanto à ocorrência de hemorragia, infecção, mortes e sinais clínicos de mal-estar físico, como pelos eriçados e alteração da atividade locomotora, além do consumo de alimentos.

Em nenhum dos grupos foram utilizados antibióticos, uma vez que se procurou seguir uma técnica rigorosa em relação a assepsia e o rato é muito resistente à infecção. Além disso, a administração de antibióticos incluiria uma nova variável que, poderia alterar as variáveis estudadas .

A partir do 21º dia cada gaiola foi inspecionada a cada 2 horas das 7 até as 18 horas para observância da ocorrência do parto.

3.3.4. - Variáveis maternas observadas.

Peso corporal, piloereção, recuperação das crias e manejo do ninho. Perda de peso e piloereção são indicativos de alteração fisiológica

decorrentes de dor e infecção, entre outras razões. A recuperação das crias e o manejo do ninho fazem parte do comportamento materno (NUMAN, 1994)

3. 3.5 - Acompanhamento das ninhadas.

Ocorrido o parto, as crias foram contadas, pesadas e sexadas. Para evitar que o número de filhotes pudesse alterar a taxa de crescimento da ninhada e dos indivíduos, o número de filhotes foi ajustado para oito, guardando-se uma proporção entre machos e fêmeas por mãe (OLIVEIRA & ROCHA, 1992). A redistribuição foi feita entre grupos de mesmo tipo de cirurgia e as ninhadas foram observadas todos os dias, para verificar as mortes entre as crias, desde o nascimento até o desmame (25^o dia).

Após a redistribuição os recém-nascidos foram marcados com tinta laca de aeromodelismo, fabricada pela Casa Aerobrás, São Paulo, SP-Brasil.

3. 3.6 - Avaliação do Crescimento e Desenvolvimento das Crias.

Para se avaliar o crescimento das crias tomou-se como indicador o peso corporal, obtido individualmente, nos seguintes dias de vida pós-natal: dia do nascimento, 5^o, 14^o, 25^o dias de vida pós-natal. O aumento do peso corporal foi tomado como indicativo indireto de boa nutrição e conseqüentemente, da normalidade do processo de lactação (COWIE & FOLLEY, 1947).

Cada mãe e respectivos filhotes foram pesados individualmente, numa balança marca Ohaus®, com tripla escala e container para espécimen.

Animais que morreram foram pesados, sexados e autopsiados, visando identificar malformações ou alterações viscerais.

3. 3.7 - Avaliação do consumo de leite

Para avaliação do consumo de leite foi utilizado o processo de separação das crias com aferição do leite consumido após determinado período (COWIE & FOLLEY, 1947) . Resumidamente consiste em separar a ninhada da mãe, exceto um filhote, pôr um período de 8 horas. A cria remanescente, devidamente identificada, tem por objetivo evitar a rejeição materna e a interrupção do mecanismo de sucção, que poderiam concorrer para alterar os resultados. Após 8 horas, as crias isoladas são pesadas individualmente e reunidas à mãe por um período de 30 minutos. Depois são novamente pesadas e a diferença de peso antes e depois do reagrupamento é considerada como medida do consumo de leite. Durante o período de reagrupamento das ninhadas observou-se o comportamento materno no que se refere à aceitação das crias, ao posicionamento adequado à amamentação e a recuperação de filhotes. As crias são observadas para verificar se todas estão presas às tetas maternas.

3. 3.8. - Determinação do início da Puberdade.

Para avaliação do início da puberdade considerou-se a descida dos testículos e a abertura vaginal. A descida dos testículos foi inspecionada diariamente a partir do 15 dia de vida, mesmo período de vida em que se observou o fenômeno na colônia de ratos. Quando ocorreu o desmame, aos 25 dias de vida, os machos e as fêmeas foram numerados pelo procedimento habitual de perfuração nas orelhas e alojados em gaiolas, onde foram agrupados conforme o tipo de cirurgia ao qual as mães foram submetidas. Prosseguiu-se ao exame diário de cada animal até que ocorresse a abertura vaginal e a descida dos testículos.

3.3.9 – Processamento estatístico.

As medidas contínuas foram analisadas por testes de “t” de Student pareado e não pareado ou por análise de variância de uma via, seguidas de testes entre grupos que variaram conforme a comparação feita.

Medidas discretas relativas a proporção foram avaliadas pelo teste do Chi quadrado. O nível de significância dos testes foi de $\alpha = 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Não foram observados alteração do comportamento materno de recuperação das crias e manejo do ninho. Ao longo do experimento ocorreram mortes maternas conforme se descreve no quadro abaixo.

Quadro I. Mortes maternas ao longo do pós-parto e até o desmame, nos diferentes grupos experimentais.

Nº DE MORTES MATERNAS		
GRUPOS	PARTO – 5º DIA	6º – 25º DIA
Controle	0	0
Pinealectomia	0	1
Controle de pinealectomia	0	1
Secção de nervo óptico	0	1
Controle de secção de nervo óptico	0	0
Pinealectomia e secção de nervo óptico	4	0
Controle de pinealectomia e secção de nervo óptico	0	0
Luz constante	0	4

A maior incidência de mortes no período “peri-operatório”, ocorreu no grupo pinealectomizados e com secção de nervo óptico. Nota-se que animais submetidos a luz permanente também exibiram mortalidade aumentada.

A tabela I. mostra a duração da gestação de ratas em dias, nos grupos submetidos aos diversos experimentos cirúrgicos, no grupo controle de colônia e no submetido a luz constante.

Tabela I. Duração da gestação de ratas submetidas a diferentes procedimentos experimentais.

GRUPOS	DURAÇÃO EM DIAS *
Controle de colônia	21,9 ± 0,7(11)
Pinelectomia	22,7 ± 0,4(17)
Controle de pinelectomia	22,4 ± 0,5(11)
Secção de nervo óptico	23,0 ± 0,4(10)
Controle de secção de nervo óptico	22,1 ± 0,3(10)
Pinelectomia e secção de nervo óptico	22,3 ± 0,8(13)
Controle de pinelectomia e secção de nervo óptico	22,5 ± 0,5(12)
Luz constante	22,6 ± 0,6(13)

* Média ± desvio padrão (n) de mães estudadas.

A análise de variância (de uma via) mostrou que entre os grupos controles, aqueles submetidos à operação simulada para remoção de pineal e secção de nervo óptico tiveram o tempo de gestação aumentado em relação ao grupo controle da colônia (Dunnett $p < 0,05$).

Animais expostos à luz constante, também tiveram o tempo de gestação aumentado em relação ao grupo controle ($t=2,64$, $gl=22$, $p=0,015$).

Quando se procede a comparação do procedimento cirúrgico efetivo com sua operação simulada, dentro de um mesmo grupo experimental (teste t de Student, não pareado), não se observam diferenças significativas quanto a duração do tempo de gestação entre o grupo de ratas pinelectomizadas e as

que sofreram operação simulada. A secção do nervo óptico, entretanto, prolongou a gestação quando comparada com a operação simulada ($t= 5,70$, $gl = 18$ e $p < 0,001$).

Na tabela II, estão os pesos corporais médios das mães, de todos os grupos experimentais, obtidos no dia do parto, no 5º e no 25º dia pós-parto.

Tabela II. Peso corporal (g), no dia do parto, no 5º dia de lactação e no desmame, de ratas submetidas a diferentes procedimentos experimentais.

GRUPOS	PESO CORPORAL *		
	Parto	5º dia	25º dia
Controle de Colônia	175,81 ± 17,9(11)	173,18 ± 17,26(11)	155,72 ± 13,13(11)
Pinelectomia	189,52 ± 15,9(17)	186,35 ± 16,41(17)	179,62 ± 21,51(16)
Controle de pinelectomia	182,18 ± 23,0(11)	178,36 ± 21,81(11)	172,90 ± 23,74(10)
Secção de nervo óptico	169,18 ± 19,5(10)	169,60 ± 17,08(10)	172,11 ± 17,72(9)
Controle de secção de nervo óptico	191,95 ± 15,7(10)	194,28 ± 15,32(10)	189,80 ± 14,49(10)
Pinelectomia e secção de nervo óptico	171,00 ± 16,4(13)	171,11 ± 17,08(9)	163,66 ± 16,34(9)
Controle de pinelectomia e secção de nervo óptico	186,8 ± 15,0(12)	170,12 ± 17,62(12)	159,81 ± 14,24(12)
Luz constante	200,30 ± 15,9 (13)	204,30 ± 17,64(13)	145,44 ± 11,87(9)

*Resultado expresso em média ± desvio padrão(n).

A análise dos dados mostra que entre o parto e o quinto dia pós-parto o grupo submetido à pinealectomia e a operação simulada perderam peso ($p < 0,001$, t pareado), enquanto os demais grupos mantiveram-no.

Ao final da lactação, exceto o grupo de secção de nervo óptico, todas as ratas reduziram o peso corporal.

Ratas submetidas ao regime de luz constante apresentaram peso corporal mais elevado em relação aos demais grupos por ocasião do parto e no 5º dia pós-parto (análise de variância, teste de Scheffé $p < 0,05$). Entre o grupo controle de colônia e operação simulada de secção de nervo óptico existe diferença significativa quando se comparam os pesos no dia parto e no período do desmame. Porém entre os grupos de operação simulada não existem diferenças significativas (teste de Dunnet).

O consumo médio de ração (por intervalo de tempo após o parto) em cada grupo experimental, encontra-se resumido na tabela abaixo:

Tabela III. Consumo médio de ração (g) em intervalos de dias, após o parto, em ratas submetidas aos diferentes procedimentos experimentais.

GRUPOS	CONSUMO DE RAÇÃO (G) EM INTERVALOS DE DIAS PÓS-PARTO*		
	1º ao 5º dia	6º ao 14º dia	15º ao 25º dia**
PNT	20,54 ± 5,51(17)	33,22 ± 5,18(17)	45,75 ± 4,25(15)
SPNT	20,28 ± 5,90(10)	32,47 ± 3,36(10)	43,27 ± 5,77(10)
XNO	23,42 ± 4,84(10)	35,35 ± 3,95(10)	47,46 ± 2,43(9)
SXNO	18,86 ± 4,48(10)	38,26 ± 3,17(10)	44,15 ± 4,57(10)
PNTXNO	20,12 ± 6,11(10)	31,31 ± 4,17(8)	44,50 ± 5,34(7)
SPNTXNO	18,66 ± 5,06(12)	32,48 ± 7,87(12)	46,16 ± 3,37(11)
LCTE	13,87 ± 3,58(13)	28,86 ± 4,50(13)	40,27 ± 2,58(9)

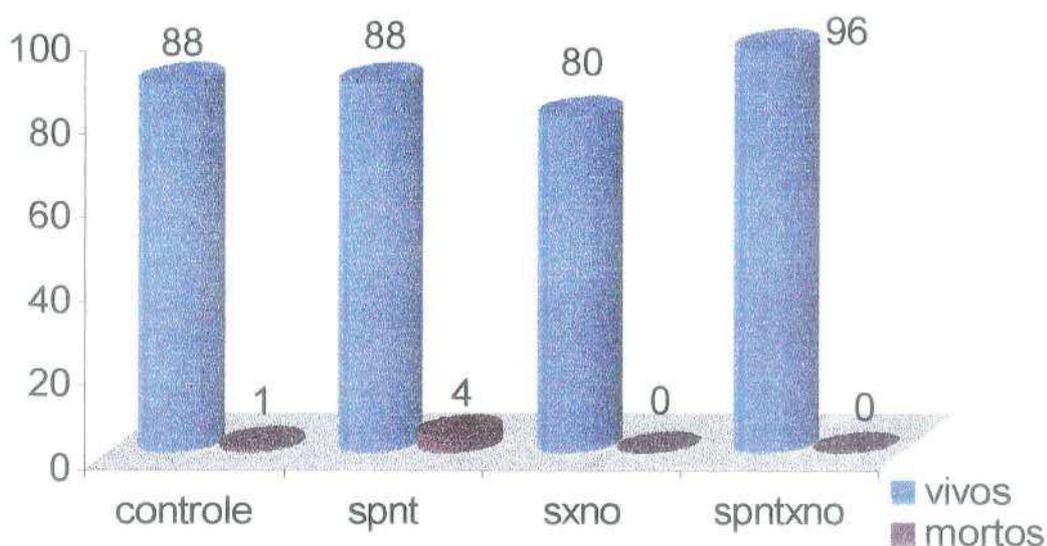
*Resultados expressos em Média ± Desvio padrão (n= número de mães).

**Corresponde ao consumo da "família " – Mães e crias.

Quando se compara o consumo médio de ração entre animais dos grupos controles nota-se que apenas o grupo controle de secção do nervo óptico consumiu mais ração ($p < 0,05$ – Dunnett), do que o controle de colônia.

Observou-se que os animais submetidos a o regime de luz constante reduziram seu consumo de ração no intervalo entre o parto e 5º dia e entre o 6º e 14º dias de vida pós-natal, quando comparados com o controle de colônia ($t=5,77$ $p < 0,001$). Quando as crias começam a se alimentar o consumo da família não apresenta diferença significativa.

Comparando-se os grupos submetidos à cirurgia efetiva e seus respectivos controles de operação simulada não se encontram diferenças significativas no consumo de ração.



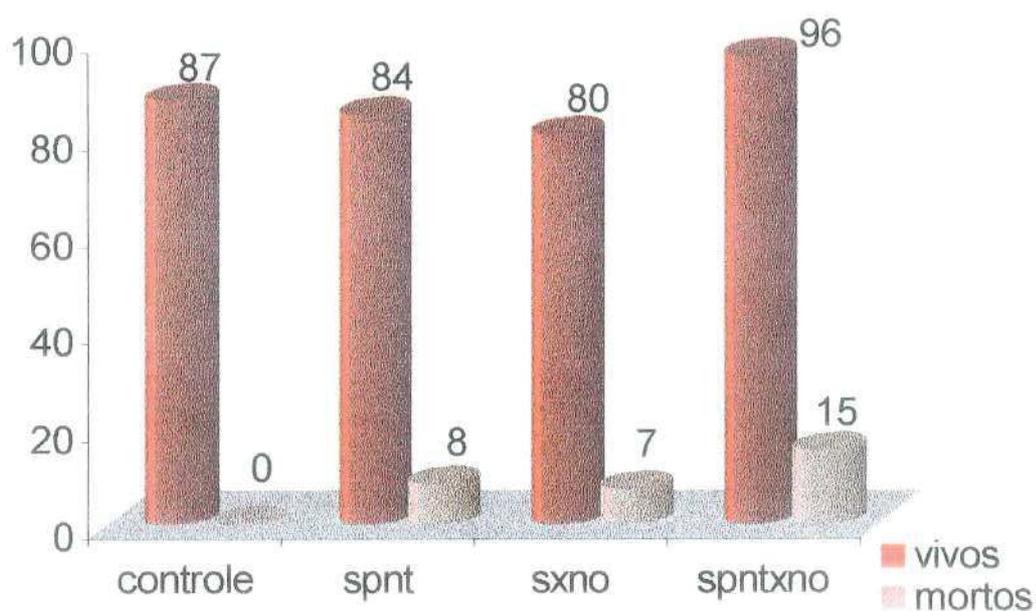
No gráfico acima, mostra-se o número de crias vivas sem distinção de sexo no intervalo entre o dia do parto e o 5º dia de vida, entre os controles de operação simulada e o controle da colônia.

Gráfico I. Número de crias vivas sem distinção de sexo ao nascimento e mortas até o 5º dia de vida, entre mães dos grupos de controle da colônia e submetidas as operações simuladas.

Observa-se maior mortalidade entre crias de mães que foram submetidas a operação simulada de pinealectomia embora a diferença não seja significativa.

No gráfico abaixo, está exposto o número de crias vivas no período do 6º ao 14º, sem discriminação do sexo entre os grupos controles de operações simuladas e controle da colônia.

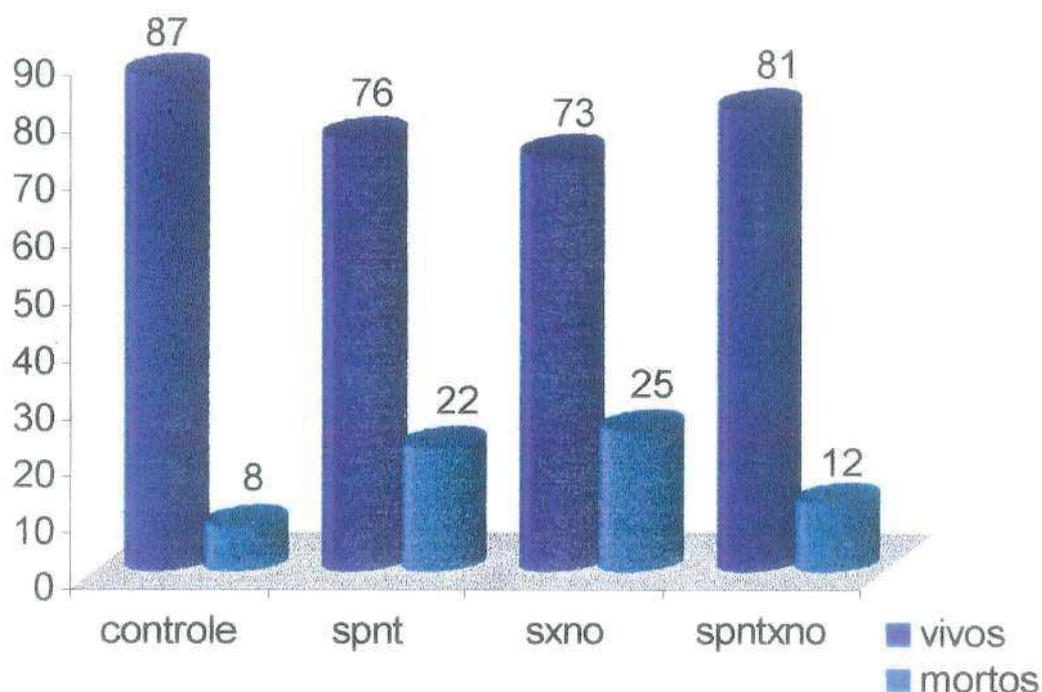
Gráfico II. Estão mostrados os números de crias vivas sem distinção de sexo no 6º dia, e as que morreram até o 14º dia, em cada grupo controle.



Os grupos submetidos a operação simulada são significativamente, diferentes do controle de colônia, mas não diferem entre si quanto ao número de mortes de crias.

O gráfico abaixo expressa o número de crias sem distinção de sexo, vivas no 15º e mortas até o 25º dia de lactação em ratas do controle de colônia e nas submetida a operação simulada.

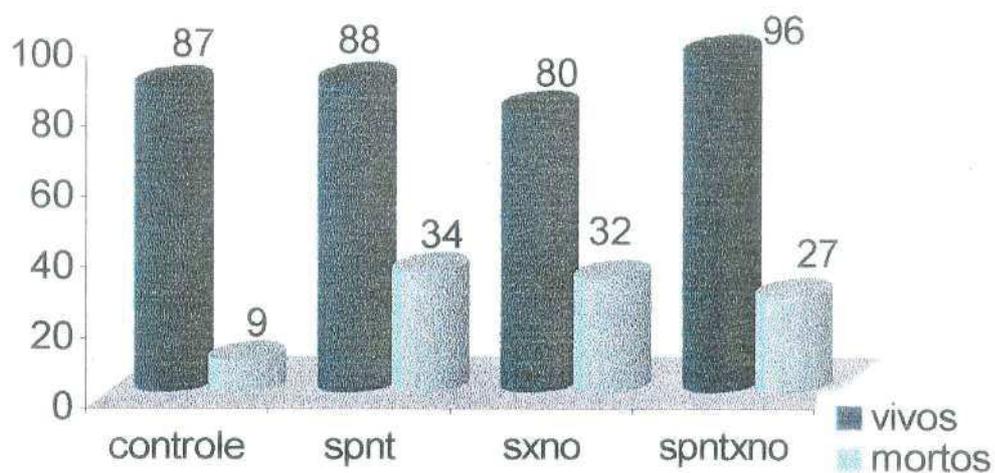
Gráfico III. Crias vivas e mortas no 15º ao 25º dia de lactação em ratas do controle de colônia e as operações simuladas.



Há diferença significativa entre os grupos submetidos à operação simulada e o grupo de ratas controle de colônia e também entre os grupos que sofreram a cirurgia. Ocorreram mortes acentuadas entre os grupos de operação simulada de pinealectomia e de secção de nervo óptico ($\chi^2 = 23,779$, $p < 0,001$).

As mortes de crias sem distinção sexo de ratas controle de colônia e as submetidas a cirurgias de operação simulada, ao longo do período de lactação encontra-se expresso no gráfico IV.

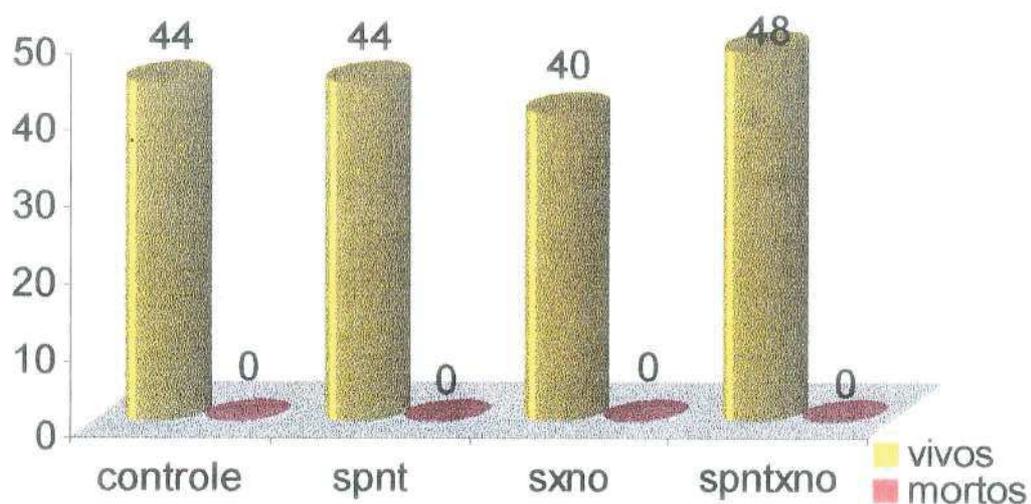
Gráfico IV. Mortes de crias durante o período completo de lactação em ratas do grupo controle e das operações simuladas.



Tomando-se o período completo da lactação (1 a 25 dias), nota-se que entre os animais submetidos à cirurgia simulada ocorreram muito mais mortes do que nos controles da colônia. Entretanto quando se comparam apenas os animais do grupo de controle de operação simulada, eles não diferem entre si.

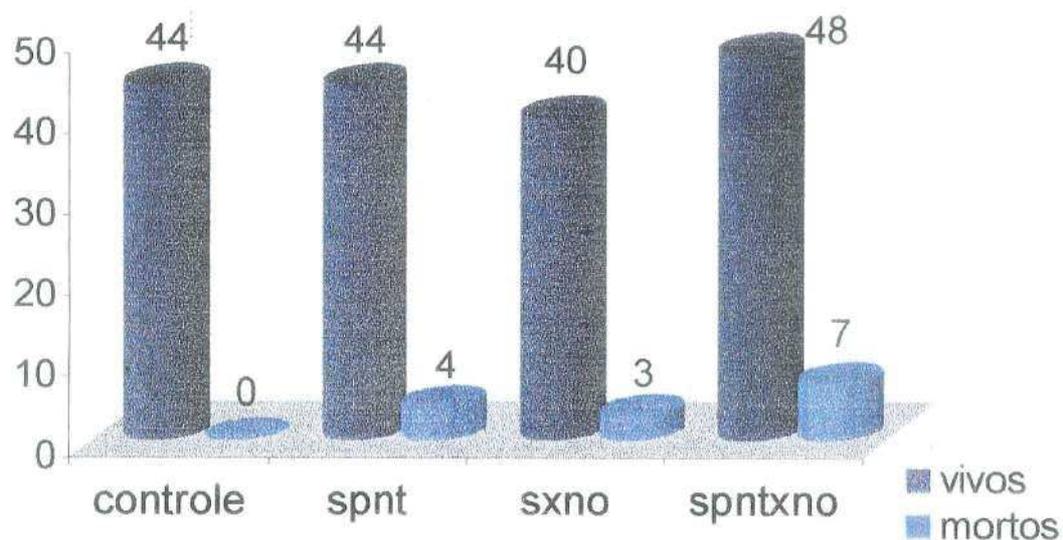
As mortes de crias do sexo masculino ao longo dos intervalos de dias de lactação em todos os grupos experimentais, encontram-se reunidos nos gráficos V, VI, VII e VIII que se seguem.

Gráfico V. Número de crias do sexo masculino em grupos de mães controles de colônia e de operação simulada entre o dia do nascimento e o 5º dia de vida pós-natal.



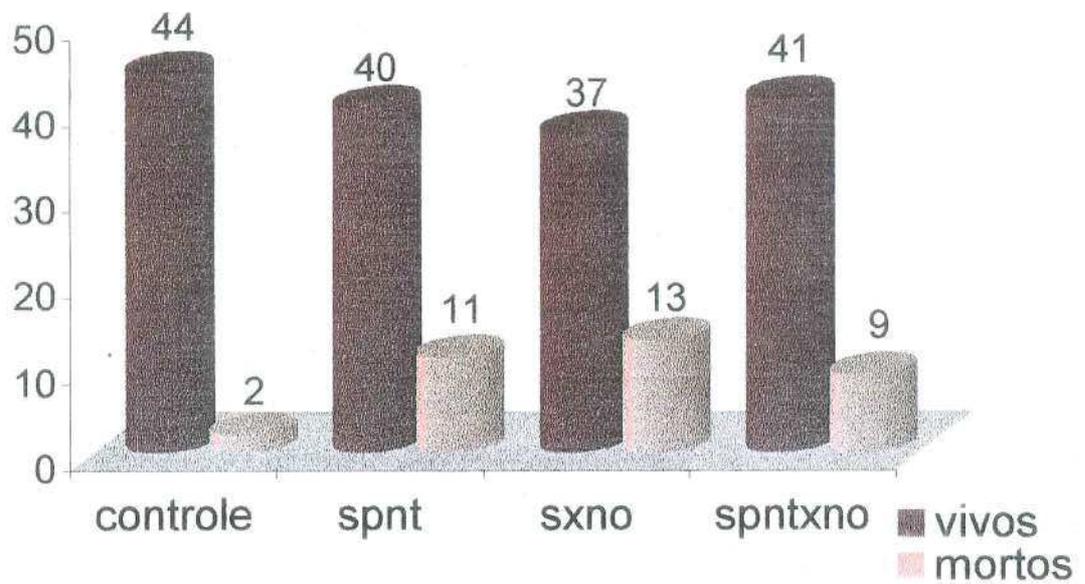
Observa-se que nos 5 primeiros dias de vida não ocorreram mortes entre crias dos grupos analisados.

Gráfico VI. Número de crias do sexo masculino em grupos de mães controles de colônia e de operação simulada entre o 6º dia e o 14º dia de vida pós-natal.



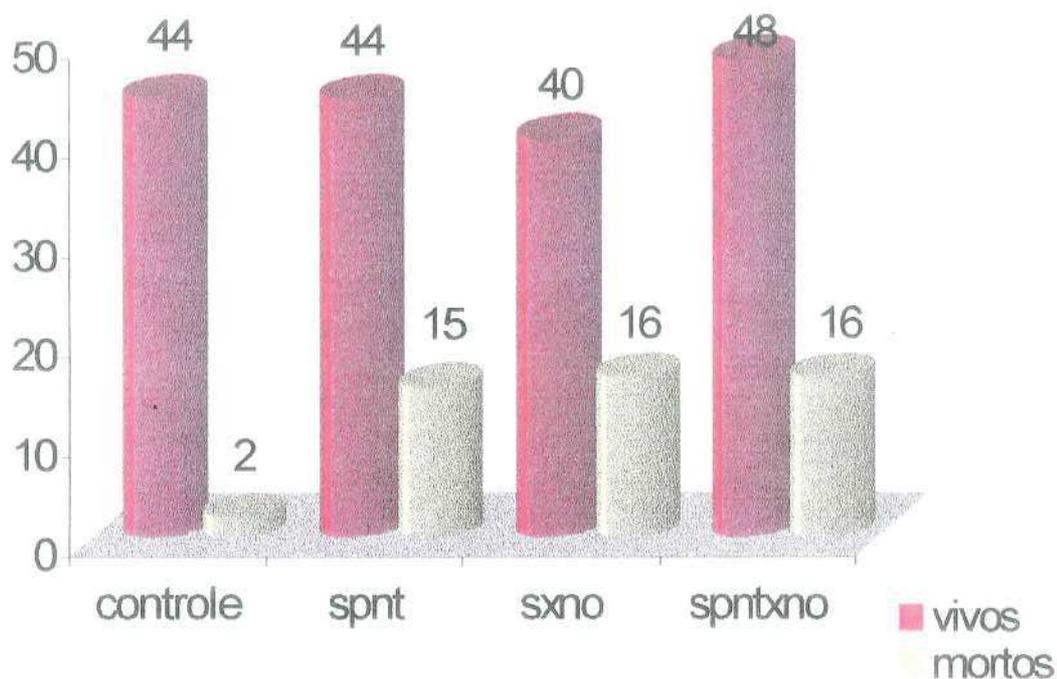
Não se observaram mortes entre as crias do grupo controle de colônia mas elas ocorreram entre as crias de mães submetidas a operação simulada, entretanto, não houve diferença significativa conforme o tipo de cirurgia.

Gráfico VII. Número de crias do sexo masculino em grupos de mães controles de colônia e de operação simulada entre o 15º dia e 25º dia de vida pós-natal.



Do mesmo modo que se observou anteriormente ocorreram mais mortes em crias dos grupos de mães submetidas à cirurgia experimental ($\chi^2 = 12,383$; $p=0,008$) do que nos controles de colônia, mas o tipo de cirurgia não interferiu com o número de mortes.

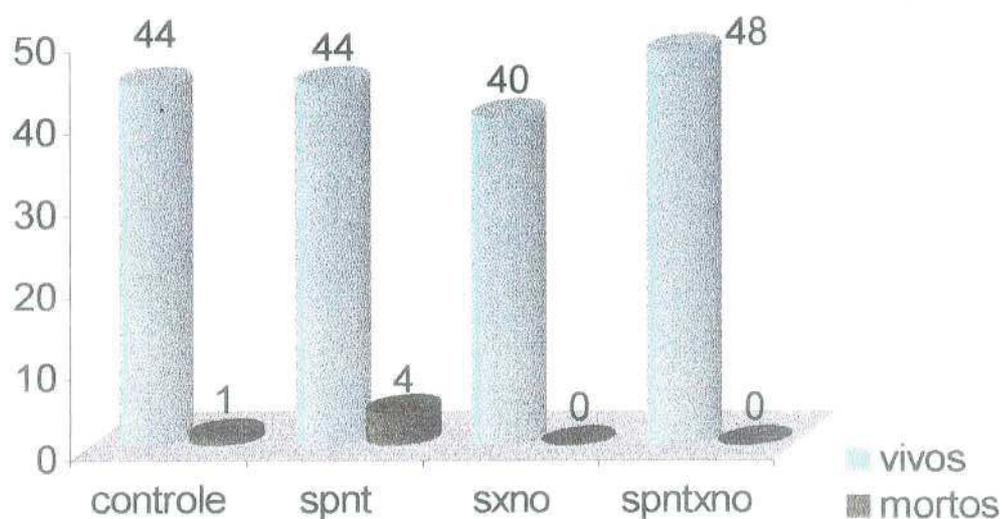
Gráfico VIII. Número de crias do sexo masculino em grupos de mães controles de colônia e de operação simulada entre o 1º dia e 25º dia de vida pós-natal.



Tomando-se em conta o total de mortes durante todo o período de lactação e desmame, observa-se uma vez mais que o tipo de cirurgia não interfere no número de mortes, embora elas sejam acentuadamente superiores às que ocorreram nos controles de colônia ($\chi^2 = 16,406$; $p = 0,001$).

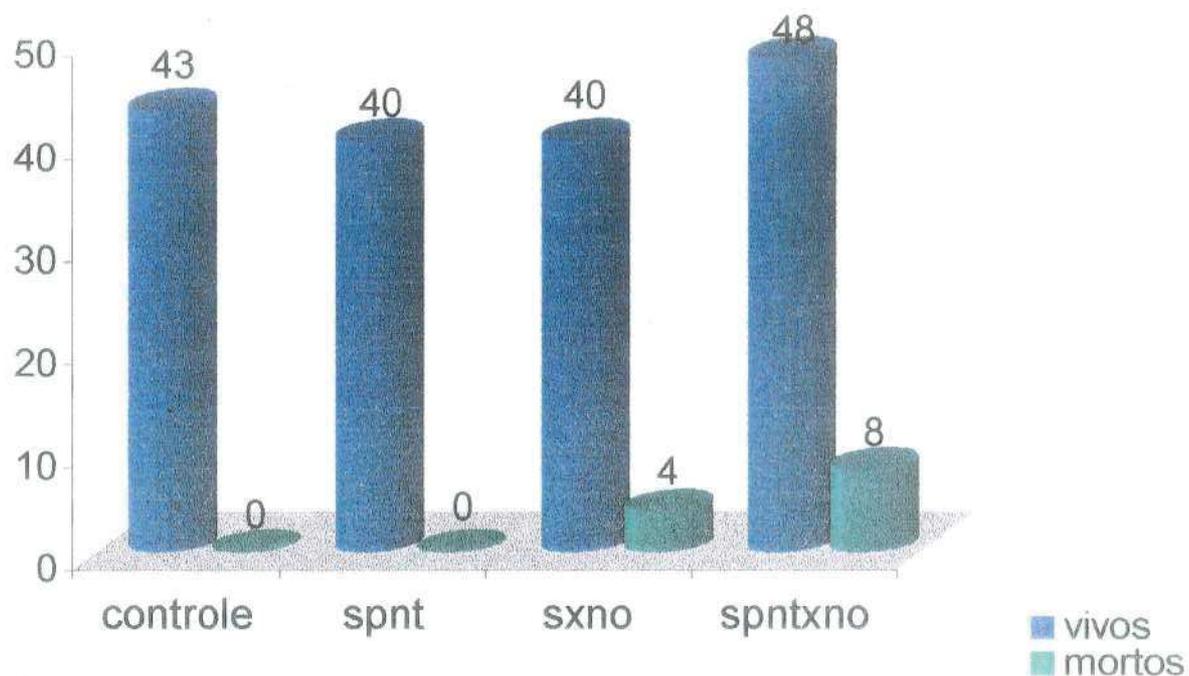
As mortes de crias do sexo feminino ao longo dos intervalos de dias de lactação, em todos os grupos experimentais, encontram-se reunidos nos gráficos IX, X, XI, e XII adiante.

Gráfico IX. Crias do sexo feminino vivas e mortas no período de 1 a 5 dias de vida pós-natal, em ratas controle de colônia e nos controles de operação simulada.



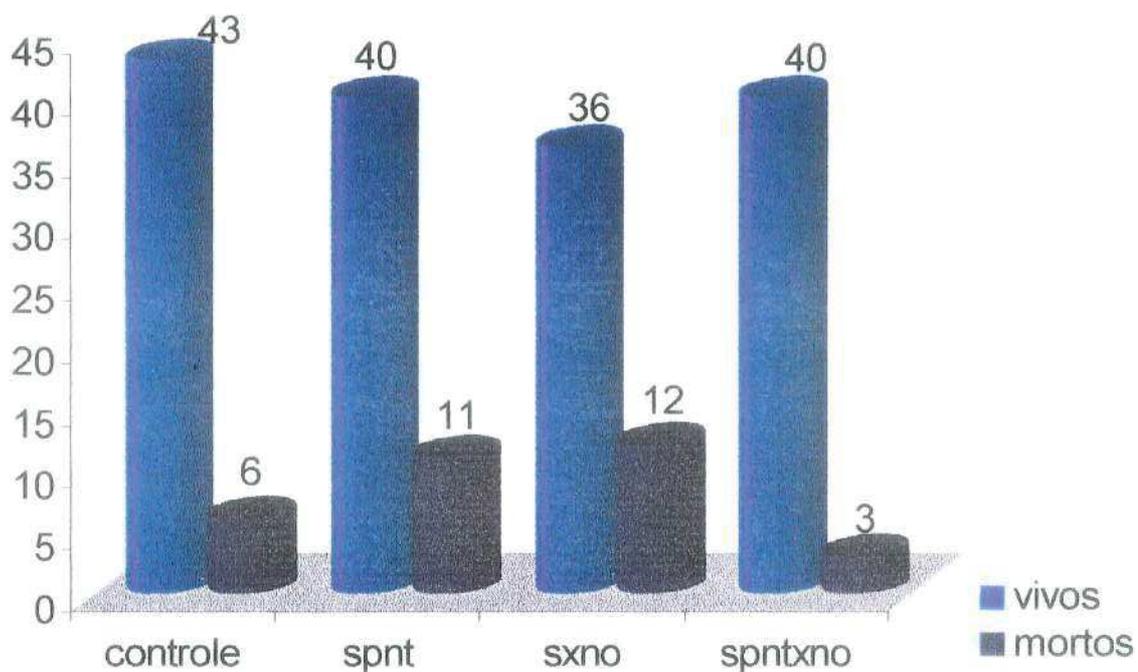
Não ocorreram diferenças significativas entre os grupos controles embora tenham havido mais mortes entre as crias de mães submetidas à operação simulada de pinealectomia.

Gráfico X. Crias do sexo feminino vivas e mortas do 6º ao 14º dia de vida do grupo controle da colônia e comparada com as operações simuladas.



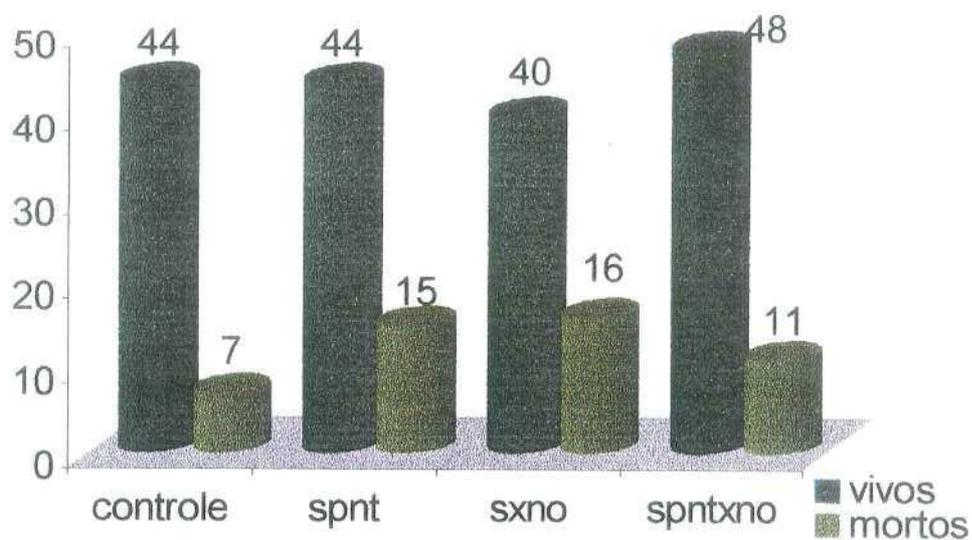
Os grupos de secção de nervo óptico e de pinealectomia+secção do nervo óptico, apresentaram maior número de mortes, quando comparados ao controle, porem comparados entre si não apresentam diferença significativa.

Gráfico XI. Crias do sexo feminino de vivas e mortas no intervalo de 15 a 25 dias de vida de mães do controle da colônia e submetidas às cirurgias simuladas,



Entre o 15º e o 25º das crias o maior número de mortes ocorre entre crias de operação simulada de pinealectomia e secreção do nervo óptico.

Gráfico XII. Total de mortes em crias do sexo feminino do grupo de ratas controle e de operações simuladas no período de 1 a 25 dias de vida.



Tomadas todas as mortes de crias de grupos controles, ao longo do período de lactação, nota-se que não há diferença significativa entre os grupos. A tabela IV. mostra a evolução do peso corporal de crias do sexo masculino, de ratas submetidas a diferentes experimentos.

Tabela IV. Peso corporal de crias do sexo masculino em diferentes intervalos de dias após o nascimento, de ratas submetidas a diferentes procedimentos experimentais.

GRUPO	PESO CORPORAL(G)/DIAS DE VIDA			
	1	5	14	25
CC	5,7 ± 1,0 (44)	8,36 ± 1,3 (43)	9,31 ± 1,4 (38)	25,42 ± 4,3 (38)
PNT	5,85 ± 0,7 (68)	8,93 ± 1,7(63)	9,60 ± 1,8 (51)	24,28 ± 6,0 (25)
SPNT	5,85 ± 0,8 (44)	9,11 ± 1,8 (40)	10,07 ± 1,5 (40)	24,16 ± 2,8 (29)
XNO	5,89 ± 0,7 (40)	8,25 ± 1,0 (40)	8,60 ± 1,3 (34)	24,34 ± 4,5 (33)
SXNO	6,18 ± 0,7 (40)	8,95 ± 1,2 (40)	9,14 ± 1,1 (37)	21,38 ± 5,3 (24)
LCTE	6,17 ± 0,5 (52)	10,82 ± 1,1 (52)	11,13 ± 1,2 (29)	19,27 ± 4,1 (18)
PNTXNO	5,3 ± 0,9 (52)	7,12 ± 2,2 (39)	8,0 ± 1,5 (29)	23,46 ± 4,6 (27)
SPNTXNO	5,7 ± 1,1 (48)	8,3 ± 1,0 (48)	8,9 ± 1,4 (40)	24,41 ± 4,4 (37)

Quando se analisam as crias de ratas controles de colônia e as de operação simulada observa-se que:

Recém-nascidos dos grupos controles têm peso semelhante. No dia 5, as crias de mães submetidas à operação simulada de pinealectomia são maiores que as crias de mães controles (Dunnet $p < 0,005$), assim como no 14º dia de vida. À época do desmame as crias de mães submetidas a operação simulada de secção do nervo óptico são menores que as de controle de colônia (Dunnet $p < 0,05$).

As crias de mães submetidas a luz constante foram maiores no dia do nascimento ($t = -2,979$; $p = 0,004$), no 5º dia ($t = -9,992$; $p < 0,001$) e no 14º dia ($t = 5,602$; $p < 0,001$), quando comparadas às crias de mães do grupo controle. Entretanto, no desmame foram menos pesadas ($t = 5,072$; $p < 0,001$).

O peso corporal de crias pinealectomizadas foi semelhante, ao longo de todo o período de lactação, ao de operação simulada.

O grupo submetido a secção de nervo óptico teve crias menos pesadas em comparação com as de operação simulada ($t = -2,834$; $p = 0,006$),

no 5º dia de vida mas, no desmame, a situação inverteu-se, com crias de operação simulada menores ($t=2,275$; $p=0,027$).

No 5º e no 14º dias de vida, o grupo de ratas pinealectomizadas e as com o nervo óptico seccionado, tiveram crias menos pesadas que as respectivas operações simuladas ($t= - 3,321$; $p=0,001$ e $t= - 2,558$; $p=0,013$, respectivamente). Quando chegaram à época do desmame não houve diferença significativa entre os grupos.

O peso corporal de crias do sexo feminino, de mães controles e submetidas a diferentes procedimentos experimentais, ao longo do período de lactação, encontra-se na tabela abaixo:

Tabela V. Peso corporal de crias do sexo feminino em diferentes intervalos de dias após o nascimento conforme o procedimento experimental a que a mãe foi submetida.

GRUPO	DIA DO PARTO	PESO CORPORAL(G)/DIAS DE VIDA		
		Dia 5	Dia 14	Dia 25
CC	5,56 ± 0,9 (44)	7,90 ± 1,3 (43)	8,83 ± 2,3 (43)	25,47 ± 4,3 (37)
PNT	5,48 ± 0,6 (68)	8,68 ± 1,5 (63)	9,11 ± 1,8 (48)	25,31 ± 5,6 (21)
SPN	5,40 ± 0,8 (44)	8,51 ± 1,8 (40)	9,48 ± 1,4 (40)	23,08 ± 3,7 (29)
XNO	5,53 ± 0,7 (40)	7,91 ± 1,1 (40)	8,55 ± 1,3 (31)	23,43 ± 3,6 (29)
SXNO	5,57 ± 0,6 (40)	8,49 ± 1,0 (40)	8,82 ± 0,9 (36)	21,04 ± 4,5 (28)
LCTE	6,67 ± 0,7 (52)	10,00 ± 0,9 (50)	10,42 ± 1,3 (22)	18,83 ± 4,3 (18)
PNTXNO	4,9 ± 0,8 (52)	7,00 ± 2,5 (39)	8,18 ± 2,5 (29)	23,66 ± 4,3 (27)
SPNTXNO	5,3 ± 0,7 (48)	7,8 ± 1,7 (48)	8,42 ± 1,2 (40)	26,38 ± 4,7 (37)

Quanto ao peso corporal de ratas grupo controle de colônia e de operações simuladas, verifica-se que, não diferem entre si, exceto as submetidas à operação simulada de secção do nervo óptico, que se apresentaram com peso reduzido em relação ao controle de colônia (Dunnet $p < 0,001$), à época do desmame.

Animais submetidos à luz constante tiveram crias mais pesadas que os de controle da colônia no dia do nascimento ($t = -6,793$; $p < 0,001$); no 5º dia ($t = -9,156$; $p < 0,001$) e no 14º dia de vida ($t = -2,99$; $p < 0,004$). À época do desmame ocorreu o inverso, as fêmeas do grupo exposto à luz constante apresentavam-se com peso significativamente menor que as do grupo controle ($t = 5,373$; $p < 0,001$).

A pinealectomia não alterou o peso o peso das crias, quando comparado ao de seu controle de operação simulada, em nenhum dos dias avaliados.

Crias de mães que tiveram secção de nervo óptico foram menos pesadas que as de controle de operação simulada no 5º dia ($t = -2,428$; $p = 0,016$), mas ocorre o inverso por ocasião do desmame ($t = 2,218$; $p = 0,031$).

Quando as ratas foram pinealectomizadas e tiveram o nervo óptico seccionado, suas crias foram menos pesadas que as de suas operação simulada ($t = -2,651$; $p = 0,009$). No 5º e no 14º dia a média do primeiro grupo é menor que a do segundo mas não ocorre diferença significativa; entretanto, ao desmame, as crias de mães pinealectomizadas e com nervo óptico seccionado foram significativamente menos pesadas que as da operação simulada ($t = -2,237$; $p = 0,003$).

Na tabela abaixo está exposto o consumo de leite de filhotes machos de ratas dos diversos experimentos, aferido no 14º dia de vida.

Tabela VI. Consumo de leite, aferido no 14º dia de lactação em filhotes machos, de ratas controles e submetidos a diferentes procedimentos experimentais.

GRUPOS	CONSUMO DE LEITE (g)*
Controle de Colônia	0,93 ± 0,52 (44)
Pinelectomia	0,50 ± 0,27 (42)
Controle de pinelectomia	0,85 ± 0,66 (32)
Secção de nervo óptico	0,82 ± 0,53 (28)
Controle de secção de nervo óptico	0,53 ± 0,27 (29)
Pinelectomia e secção de nervo óptico	0,40 ± 0,22 (23)
Controle de pinelectomia e secção de nervo óptico	0,56 ± 0,39 (31)
Luz constante	0,50 ± 0,35 (24)

* Resultado expresso em média ± desvio padrão (n = número de filhotes).

A análise da ingestão de leite entre animais do grupo controle de colônia e controles de operação, evidencia que houve menos consumo de leite: entre as crias de mães submetidas à simulação de pinelectomia e à pinelectomia com secção de nervo óptico (ANOVA – uma via, Boferroni $p=0,005$).

Crias de ratas submetidas a luz constante ingeriram menos leite, quando comparadas ao grupo controle ($t=3,662$; $p < 0,001$).

O grupo de crias de ratas pinelectomizadas ingeriu menos leite que os de operação simulada ($t=3,117$; $p=0,003$).

Não houve diferença significativa da ingestão de leite no grupo de crias de mães pinelectomizadas e com secção de nervo óptico, em relação ao seu controle de operação simulada.

Na tabela abaixo está exposto o consumo de leite de filhotes fêmeas de ratas submetidas aos s diversos experimentos.

Tabela VII. Consumo de leite aferido no 14º dia de lactação por filhotes fêmeas de ratas dos grupos controles e submetidas a diferentes procedimentos experimentais.

GRUPOS	CONSUMO DE LEITE (g)*
Controle de Colônia	0,86 ± 0,43 (41)
Pinelectomia	0,52 ± 0,30 (39)
Controle de pinelectomia	0,70 ± 0,39 (32)
Secção de nervo óptico	0,76 ± 0,47 (27)
Controle de secção de nervo óptico	0,60 ± 0,34 (25)
Pinelectomia e secção de nervo óptico	0,56 ± 0,37 (20)
Controle de pinelectomia e secção de nervo óptico	0,60 ± 0,41 (33)
Luz constante	0,53 ± 0,40 (18)

* Resultado expresso em média ± desvio padrão(n).

A ingesta de leite pelos animais do grupo submetido a secção de nervo óptico foi menor que no grupo controle (ANOVA uma via, Bonferroni $p < 0,05$) embora não difira dos demais grupos de operação simulada.

As crias de mães submetidas a luz constante apresentavam ingesta de leite em menor quantidade, quando comparadas com os controles de colônia ($t=2,770$ $p=0,008$).

Entre os animais pinelectomizados também se observou redução de ingesta quando comparada à operação simulada de pinelectomia ($t=2,198$ $p=0,031$).

No quadro 2 encontra-se o percentual de crias do sexo masculino, que evidenciaram ingesta de leite (por aumento de peso) e as que aparentemente não ingeriram leite (diferença de peso zero).

Quadro 2. Percentual de crias do sexo masculino que ingeriram leite.

GRUPOS	TOTAL	INGESTA +	%
Controle de colônia	44	44	100
Secção de nervo óptico	34	26	76,5
Operação simulada de nervo óptico	37	30	81,1
Operação simulada de pinealectomia	40	31	77,5
Pinealectomia	51	47	92,1
Pinealectomia e secção de nervo óptico	30	23	76,7
Operação simulada de pinealectomia e secção de nervo óptico	41	31	75,6
Luz constante	29	28	96,5

Não houve diferença significativa entre crias, nos diversos grupos experimentais e controles, quanto à ingesta de leite.

No quadro 3 encontra-se o percentual de crias do sexo feminino que evidenciaram ingesta de leite (por aumento de peso) e as que aparentemente não ingeriram leite (diferença de peso zero).

Quadro 3. Percentual de crias do sexo feminino que ingeriram leite.

Grupos	Total	Ingesta +	%
Controle de colônia	43	41	95,3
Secção de nervo óptico	31	27	87,1
Operação simulada de nervo óptico	36	25	69,4
Operação simulada de pinealectomia	40	34	85
Pinealectomia	48	39	81,2
Pinealectomia e secção de nervo óptico	29	19	65,5
Operação simulada de pinealectomia e secção de nervo óptico	40	36	90,4
Luz constante	22	19	86,4

Houve menor número de crias que evidenciaram ingestão de leite entre o grupo de ratas que sofrem operação simulada de secção de nervo óptico ($\chi^2 = p < 0,005$), não foram observadas outras diferenças significativas.

Tabela VIII. Mortalidade das crias do sexo masculino a diferentes intervalos de dias após o nascimento, em ratas controles de colônia e nas submetidas a diferentes procedimentos experimentais.

GRUPO	CRIAS AO NASCIMENTO	INTERVALO DE DIAS							
		1 - 5		6 - 14		15 - 25		Total	
		(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n)	%
CC	44	0	0,0	0	0	2	4,5	2	4,5
PNT	68	5	7,3	12	19,0	26	51,0	43	63,3
SPNT	44	0	0,0	4	9,1	11	27,5	15	34,1
XNO	40	0	0,0	6	15,0	1	2,9	7	17,5
SXNO	40	0	0,0	3	7,5	13	35,1	16	40,0
LCTE	52	0	0,0	23	44,2	2	6,9	25	48,1
PNTXNO	52	13	25,0	9	23,1	4	13,3	26	50,0
SPNTXNO	48	0	0,0	7	14,6	9	21,9	16	33,3
TOTAL	388	18		75		47		201	

Considerando-se os pares de grupos experimentais submetidos a operação efetiva e a operação simulada encontrou-se:

- (a) Não houve diferença significativa entre os grupos controles em quaisquer dos intervalos de vida pós-natal.

- (b) No grupo de mães pinealectomizadas maior percentual de mortes de crias entre o 15^o e o 25^o dias de vida pós-natal ($\chi^2 = 4,196$, $p = 0,01$) assim como no total do período (1 - 25 $\chi^2 = 7,95,8$, $p=0,005$).
- (c) Os grupos submetidos a secção de nervo óptico não diferem da operação simulada nos intervalos de 1 – 5 e 6 – 14 dias de vida.
- (d) O grupo de mães que foi pinealectomizado e teve secção de nervo óptico, perdeu mais crias que o da operação simulada, nos primeiros 5 dias de lactação, porém, a partir daí não houve diferença significativa e, em termos de total de morte no período de lactação ao desmame, não foi diferente do grupo de operação simulada.
- (e) Mães que permaneceram em regime de luz constante não tiveram perdas de crias nos 5 primeiros dias de lactação. Durante o período de lactação plena (6 – 14), tiveram 44,2% de mortes de crias. A partir de então, não diferem do controle de colônia.

A tabela abaixo mostra a evolução da mortalidade de crias do sexo feminino ao longo do período de lactação, submetidas aos diferentes procedimentos experimentais.

Tabela IX. Mortalidade das crias do sexo feminino, em intervalos de dias de vida, em ratas dos grupos controles e nas submetidas aos diferentes procedimentos experimentais.

GRUPO	Crias no dia do nascimento	INTERVALO DE DIAS APÓS O NASCIMENTO							
		1-5		6-14		15-25		Total	
		(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n)	%
CC	44	1	2,2	0	0	6	13,6	7	15,9
PNT	68	5	7,3	15	22,1	7	39,7	27	39,7
SPNT	44	4	9,0	0	9,0	11	25,5	15	34,1
XNO	40	0	0	9	2,5	2	5,0	11	27,5
SXNO	40	0	0	4	10,0	12	30,0	16	40,0
LCTE	52	2	3,8	28	54,0	4	7,6	34	65,4
PNTXNO	52	13	25	11	21	2	3,8	26	50
SPNTXNO	48	0	0	8	16,6	3	6,25	11	22,9
Total	388	25		75		47		147	

Os grupos controle de colônia e operação simulada, não diferiram durante o período de lactação plena. Do 16^o ao 25^o dia, o grupo controle teve menor ocorrência de mortes que os grupos de cirurgia de operação simulada, entretanto, esses últimos não diferiram entre si.

No período de lactação plena (1–15), não ocorreram diferenças significativas, entre os grupos de operação simulada, embora as mortes tenham sido mais freqüentes que no grupo controle de colônia. Durante o intervalo de 1 a 5 dias de vida ocorreram maior número de mortes entre crias dos grupos que sofreram pinealectomia e secção de nervo óptico ($\chi^2 = 11,671$; $p < 0,001$), enquanto nos outros grupos, não houve diferença significativa. No intervalo de lactação plena (6 a 14 dias de vida), os grupos não diferiram entre si quanto ao número de crias mortas. O intervalo de 15 – 25 dias mostrou maior percentual de mortes no grupo submetido à operação simulada de secção de nervo óptico ($\chi^2 = 5,746$; $p = 0,0017$).

Tomado o conjunto de mortes ao longo do período de lactação não houveram diferenças significativas entre os grupos de cirurgia efetiva e os de simulada.

Crias de ratas submetidas a luz constante não diferiram quanto ao controle nos intervalos de 1 – 5 e de 15 – 25 dias, porem, durante o período de lactação plena ocorreram 54% de mortes quando a rata ficou sob luz constante, o que é significamente diferente dos 0,0% de mortes no grupo de controle da colônia.

Tabela X. Descida dos testículos em crias de ratas cujas mães foram submetidas as diferentes cirurgias.

GRUPO	DESCIDA DOS TESTÍCULOS (EM DIAS DE VIDA)			TOTAL
	14-18	19-21	>21	
CC	05	31	06	42
PNT	05	13	07	25
SPNT	06	16	07	29
XNO	14	19	00	29
SXNO	03	20	01	24
LCTE	0	0	27	27
PNTXNO	0	0	22	22
SPNTXNO	09	15	0	24
TOTAL	42	114	70	222

Nenhum dos grupos apresentou descida dos testículos antes do 14º dia de vida.

Os animais dos grupos controles de colônia e operação simulada não diferem entre si quanto ao período de descida dos testículos. Os grupos submetidos a luz constante e à pinealectomia mais secção de nervo óptico tiveram retardo significativo da descida dos testículos, todos ocorrendo após o 21º dia de vida. No intervalo de 4 a 18 dias, onde ocorreram 18,9% das descidas dos testículos de todas as crias, a secção de nervo óptico, contribui com 42,4% dos casos, contra 12% dos de controle de operação simulada, uma diferença significativa ($\chi^2 = 4,601$, $p = 0,032$), naquele intervalo de vida.

Tabela XI. Abertura vaginal em crias de ratas, cujas mães foram submetida a diferentes cirurgias

GRUPOS	ABERTURA VAGINAL EM INTERVALO DE DIAS DE VIDA PÓS-PARTO				TOTAL
	31-35	36-40	41-45	>45	
CC	7	26	3	0	36
PNT	5	16	0	0	21
SPNT	15	14	0	0	29
XNO	14	15	0	0	29
SXNO	6	14	8	0	24
LCTE	0	0	0	18	18
PNTXNO	0	0	0	22	22
SPNTXNO	5	20	4	0	29
TOTAL	52	105	15	40	208

Analisando-se a abertura vaginal em grupos de ratas controles de colônia e de operações, verifica-se que exceto pelo grupo de operação simulada, que teve cerca de metade dos animais com abertura vaginal entre 31-35 dias e a outra metade dos animais com abertura vaginal entre 36-40, não houve diferença significativa entre os demais grupos.

Ratas submetidas a luz constante e aquelas que foram submetidas a pinealectomia mais secção de nervo óptico, tiveram crias com retardo na abertura vaginal em 100% dos casos após 45 dias devida em contraposição com as dos demais grupos que em sua maioria apresentou a abertura ente os dias 36-40 de vida pós-natal.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Desde 1925, quando as primeiras observações indicaram que a função gonadal de algumas aves era regulada pela luz ambiental (WURTMAN, AXELROD & KELLY, 1968), o estudo da pineal e os ritmos reprodutivos tem intrigado os fisiologistas (SHORT, 1985). THIEBLOT (1947), estudou a consequência da pinealectomia em ratas e inferiu que a extirpação da glândula não parecia ter efeito sobre o desenvolvimento ponderal, porém o desenvolvimento gonadal era acelerado. O desenvolvimento sexual de mamíferos e seus ciclos reprodutivos vem sendo associados à função da pineal, principalmente após a melatonina ter sido isolada em 1959 (WURTMAN, AXELROD & KELLY, 1968; AXELROD, 1992, MACHADO, 1993).

A pinealectomia representa um estresse importante e a resposta endócrina e metabólica ao trauma deve ser considerada. A ocorrência de mortes entre mães submetidas à cirurgia simulada, em comparação ao controle da colônia, mostra que 07 mães foram ao óbito (Quadro I).

As variáveis ligadas ao ato operatório, como a perda sangüínea, manipulação tecidual levando a necrose e dor e o ato anestésico, podem ser considerados como os causadores de tais mortes (DRIPPS, 1965; PRICE & DRIPPS, 1965; WOLLMAN & DRIPPS, 1965; WAYNFORTH, 1980).

As mortes maternas pós-operatórias foram mais freqüentes no grupo de mães que sofreram pinealectomia + secção de nervo óptico. Nestes casos a cirurgia foi mais longa, ocorreu maior manipulação de tecidos e a perda sangüínea foi maior, além de um tempo de exposição ao anestésico mais prolongado. Ao maior estresse cirúrgico soma-se que estes animais foram desafiados em relação ao ritmo claro-escuro uma vez que tiveram seus nervos ópticos cortados, o que impediu o estímulo fótico de chegar até o núcleo supraquiasmático (AXELROD, 1992; GAUER, MASON-PEVET, PEVET, 1993; MOORE, 1996, 1997; AKIYAMA, 1998).

A remoção da pineal também deixa o animal sem condição de informar ao eixo hipotálmo-hipófise e demais órgãos periféricos as variações rítmicas

do ciclo claro-escuro (GAUER, MASSON-PEVET & PEVET, 1993; GILLETTE & McARTHUR, 1996).

Na verdade as mães e crias ficaram sem sinais aferentes dos sincronizadores biológicos, principalmente o núcleo supraquiasmático, ficando durante um período crítico sem informações do principal estímulo ambiental (DIAZ, 1995; FERNANDEZ, 1995; ZITOUNI, PEVET, MASSON-PEVET, 1997, NAITOH, 1998), até outros centros cerebrais assumirem a função sincronizadora novamente (REPPERT, DUNCAN & GOLDMAN, 1985).

Nos animais mantidos sob luz constante, temos alteração da sincronização temporal pela exposição a um fotoperíodo contínuo, existindo inibição inicial da melatonina e alteração em seu efeito modulador da secreção da prolactina, o que altera o ritmo circadiano do animal. Posteriormente a inibição da melatonina deixa de ocorrer, com normalização de sua secreção (LEON, 1985; CASSONE, 1992). Existe, ainda, nesta situação, o estresse induzido que vai alterar diversos eixos hormonais e modificar o comportamento materno (RELKIN & ADACHI, 1972; ROMEO et al., 1990; MOOS & FREUND-MERCIER, 1991; REGHUNGANADAN, REGHUNGANADAN, MARYA, 1991; McCARTHY, CURRAN & SIEGEL, 1994; SHEPHARD & SHEK, 1997; TECLEMARIAN-MESBAH, 1997; CHIODERA et al., 1998).

Posteriormente a liberação da melatonina sendo normalizada e com o amadurecimento das crias, que aos poucos tornam-se aptas para se alimentar com ração, nota-se que a mortalidade vai sendo diminuída e o peso da mãe normalizado (Tabela II). Embora as mães submetidas à cirurgia de operação simulada de pinealectomia + secção de nervo óptico tenham aumentado, estatisticamente ($p < 0,05$), o tempo de gestação em relação ao demais grupos controle de colônia e operação simulada, a diferença não parece ter significado biológico visto que a variação é em fração de dia e que pode ser atribuída ao estresse cirúrgico (Tabela I) (WAYNFORTH, 1980). Tal fato não ocorre quando se avalia os animais com secção de nervo óptico, que prolongou em, praticamente, um dia a gestação quando comparada a operação simulada de secção de nervo óptico (Tabela I, $p < 0,001$).

O parto é um processo que depende de um sincronismo entre feto e mãe e que se realiza graças a um aumento súbito e prolongado de ocitocina circulante (YEN, 1991). A remoção da via fotoreceptora pode ter influenciado no processo de liberação de ocitocina, assim como na sincronização entre feto e mãe (REPPERT, DUNCAN & GOLDMAN, 1985), uma vez que para detectar o momento ideal do parto a mãe deve receber estímulos do meio informando o momento exato do fotoperíodo. Em mães desafiadas não existe sinal da melatonina para o núcleo supraquiasmático, e este é o principal marca-passo neural do ritmo claro escuro (MOORE, 1990, 1992, 1996, 1997).

O núcleo supraquiasmático emite aferências para o núcleo paraventricular, no núcleo paraventricular temos a via hipotálamo-hipofisária que se origina na porção magnocelular e termina na neuro-hipófise, onde libera ocitocina e vasopressina. Além do controle hormonal o núcleo paraventricular tem um papel na modulação do fotoperíodo, uma vez que lesões aí localizadas podem prevenir as alterações gonadais induzidas em animais com fotoperíodos aumentados experimentalmente, e inibir os picos noturnos de melatonina (HASTINGS et al., 1985; MOORE, 1990, 1992, 1996, 1997). O núcleo paraventricular emite ainda de sua porção parvocelular eferências, que terminam ao nível da coluna intermédia lateral da medula torácica alta com a ocitocina tendo aí uma ação de neurotransmissor inibidor, que quando liberado age sobre os neurônios do sistema nervoso autônomo, bloqueando a produção de melatonina. Formando talvez uma alça modulatória do sistema nervoso central em relação à pineal (HASTINGS et al., 1985). Esta hipótese de via encontra-se esquematizada na Figura 14.

Na modulação do trabalho de parto estão envolvidos diversas alças hormonais que liberam ou inibem hormônios e comportamentos, com evidente necessidade de sincronização entre a mãe o feto e o meio. Embora não tenhamos encontrado a conexão direta (alça ou eixo hormonal) envolvendo a pineal e a ação do núcleo supraquiasmático no controle podemos supor a existência de tais ligações (MOOS & FREUND-MERCIER, 1991; CHIODERA, et al., 1998)

Nos animais desafiados o atraso no parto pode então ser atribuído em parte pela ruptura destes mecanismos modulatórios (HASTINGS et al., 1985, YEN, 1990; JAFFE, 1990; MOORE, 1990, 1992, 1996, 1997; DAWSON & van den HEUVEL, 1998, JUSZCZAK, 1998).

A importância da luminosidade correta faz-se também notar quando se verifica que animais que não foram estressados pela cirurgia, mas que ficaram sob regime de luz constante, também prolongaram o tempo de gestação ($p=0,015$), quando comparados com o controle (tabela II). A fotoinibição leva o animal a um estado de desregulação do eixo hipotálmo-hipófise, com, inicialmente, diminuição dos níveis de melatonina e aumento das β -endorfinas hipotalâmicas, o que leva a uma desmodulação do eixo reprodutivo, provavelmente, também, perturbando o início do trabalho de parto (HASTINGS, 1985, JAFFE, 1990; LIU et al., 1991; REGHUNGANADAN, REGHUNGANADAN, MARYA, 1991; CASSONE, 1993).

O peso corporal materno diminui ao longo da lactação, devido ao consumo de nutrientes corporais que são convertidos em leite com o fim de alimentar as crias (BRONSON, 1988). Nota-se que o peso das mães submetidas ao regime de luz constante foi maior no dia do parto (tabela II), entretanto, os animais deste grupo foram os que menos consumiram ração ($p < 0,01$ – tabela III), no período correspondente ao de lactação plena das crias (parto ao 14º dia de lactação). A redução no consumo de ração provavelmente é causada pela alteração no ritmo biológico que é consequência da alteração da fotoperiodicidade.. Modificações da fotoperiodicidade alteraram o ritmo de secreção hormonal, e o desequilíbrio hormonal leva a um comportamento materno anômalo, com contatos alterados com a cria, embora não mude em muito seu padrão (LEON, 1985).

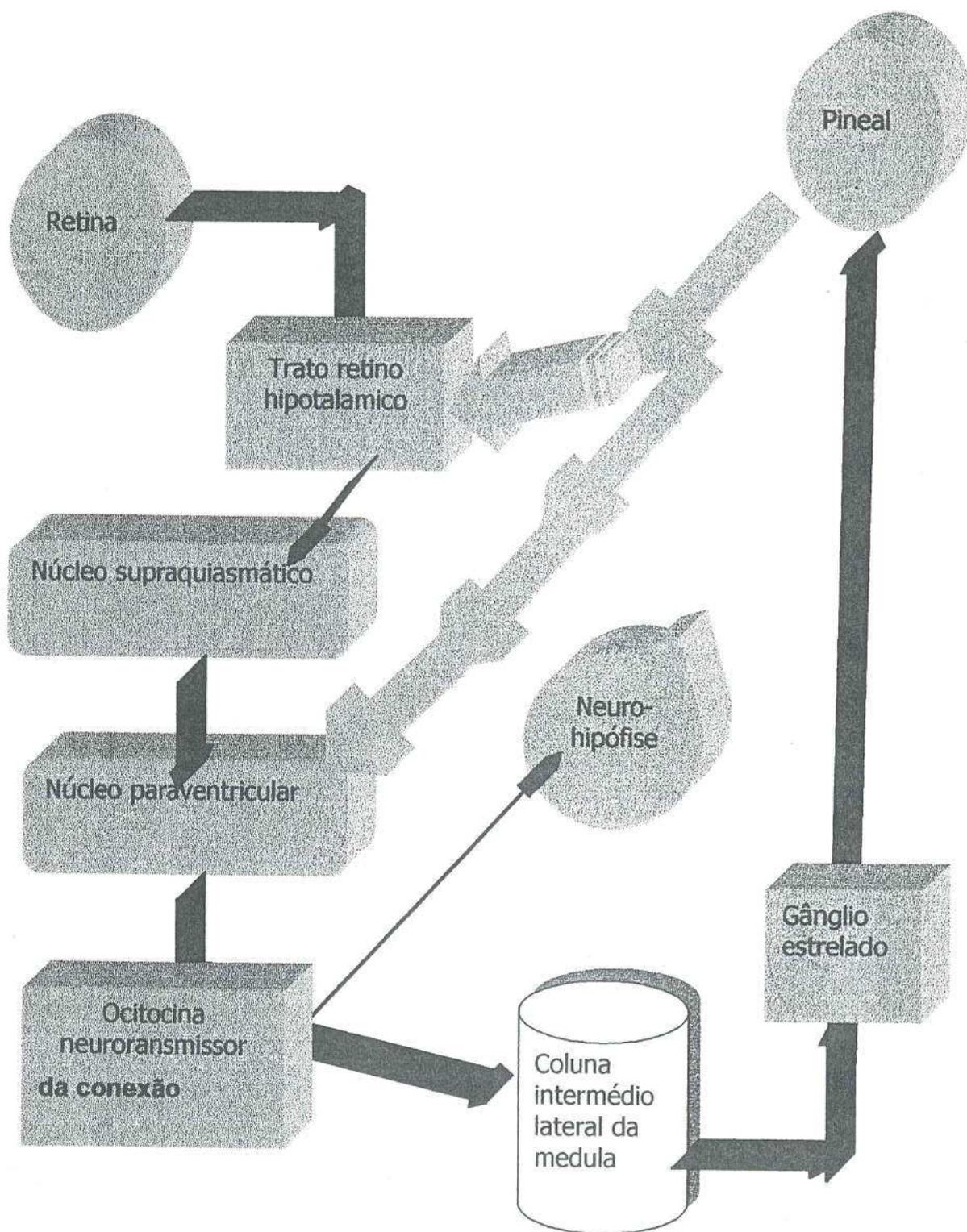


Figura 14. Vias de ligação entre o núcleo supraquiasmático e a ocitocina e sua possível sincronização do parto. Setas tracejadas seriam a via de ligação proposta ligando o controle do trabalho de parto pela luz. Construído através de informações de HASTINGS et al., 1985; Yen, 1991, MOOS & FREUND-MERCIER, 1991; CHIODERA, 1998).

alimentar de maior consumo de alimentos e água à noite, tais mudanças podem ser refletidas diretamente no ganho ponderal dos filhotes conforme demonstra o experimento de LEON (1985).

Os gráficos de 1 a 12 mostram claramente que o procedimento cirúrgico é estressante para as mães e crias, pois ocorre maior número de mortes entre os grupos submetidos à cirurgia do tipo operação simulada, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$). Portanto, tornou-se necessária a comparação de mortes de filhotes entre pares de grupos: controle de colônia X luz constante e cirurgias efetivas X cirurgias simuladas.

A secção de nervo óptico não influenciou sobre a sobrevivência das crias do sexo masculino, quando comparada à operação simulada e, comparativamente aos demais procedimentos experimentais, foi o que menos mortes causou (17,5%, tabela IV). Pode-se dizer que provavelmente, à parte o estresse cirúrgico, a recuperação do ritmo biológico é rápida e há uma adaptação a um novo ritmo circadiano (WAYNFORTH, 1980; REPERT, DUNCAN & GOLDMAN, 1985).

A mortalidade de crias do sexo masculino foi mais acentuada no grupo de mães pinealectomizadas, no período do 15º ao 25º dia de vida, enquanto que as crias de mães submetidas a pinealectomia + secção de nervo óptico, tenderam a morrer mais nos primeiros dias de vida. Já àquelas submetidas à luz constante, tiveram maior percentual de morte durante o período de lactação plena (44,2% de mortes), (tabela IV).

A luz constante modifica o comportamento materno e alimentar das mães. Em relação ao tempo de contato com as crias esta disponibilidade não é diminuída, porém a constância do contato é afetada, levando a um baixo rendimento ponderal do filhotes (LEON, 1985)

Quando se avaliam as mortes de crias do sexo feminino (tabela V), verifica-se o mesmo comportamento ocorrido com os filhotes machos em relação aos grupos controles de colônia e de operação simulada. Entre as fêmeas, ocorreu maior índice mortes nos primeiros 5 dias de lactação, em crias de mães que foram submetidas a pinealectomia + secção de nervo óptico. No

conjunto entretanto, animais submetidos a operação simulada tiveram um número de mortes semelhantes.

As crias do sexo feminino, de mães submetidas à luz constante tiveram 54% de mortes durante o período de lactação plena.

As causas prováveis de morte das crias podem ser explicadas pelo menor consumo de leite no período de lactação plena, por redução na sua produção pela mãe, por alteração no comportamento materno que não permite o seu consumo ou por alteração no comportamento da própria cria que não mamou adequadamente ou por alteração da qualidade do leite (LEON, 1985).

A dessincronização age diretamente nos picos de secreção de melatonina, levando a alteração no comportamento materno, que é mediado também pela prolactina (DIAZ et al., 1995). A pinealectomia diminui os níveis de prolactina em ratos, alterando o comportamento materno e a produção basal de leite (RELKIN & ADACHI, 1972; REPERT et al, 1985, NUMAN, 1994; ZITOUNI, PEVET & MASON-PEVET, 1996).

Os fetos sendo dependentes dos estímulos maternos, para sua própria sincronização, podem ter seus ritmos alterados, e seu comportamento alimentar prejudicado ou mesmo ter um baixo aproveitamento dos nutrientes ingeridos.

Pode também ter ocorrido alteração na qualidade do leite já que é dependente do estado nutricional materno e de condições basais do metabolismo hormonal envolvido na produção e ejeção do leite, fatores estes ligados a sincronização dos ritmos endógenos ultra-radianos (TUREK & van CAUTER, 1988).

O peso corporal de machos e fêmeas dos grupos controles de colônia e de operação simulada não foi diferente ao nascimento. A partir do 5º dia, os grupos de mães submetidos à operação simulada, não foram diferentes entre si mas o foram em relação ao controle de colônia (tabelas VI e VII), o que indica que o estresse cirúrgico contribui para a modificação do peso das crias. Dada a diferença encontrada procedeu-se a comparação dos grupos aos ares: cirurgia efetiva X cirurgia simulada e luz constante X controle de colônia.

Entre os machos, os filhotes de mães dos grupos com secção de nervo óptico e pinealectomia + secção de nervo óptico, perderam peso entre os dias 5 e 14 de vida pós natal. Estes filhotes estão nos grupos onde a informação do fotoperíodo não é transmitida à mãe e conseqüentemente ao filhote.

O feto é dependente da sincronização materna seja pelo efeito da melatonina, que atravessa facilmente a barreira placentária, ou por efeito mediado pelo núcleo supraquiasmático materno via inervação simpática, com aferência até as terminações nervosas da placenta. Esta dependência será mantida até cerca do 4º dia de vida pós-natal quando se inicia a inervação do núcleo supraquiasmático da cria e com a geração de ritmos que aparecerão a partir do 6º dia de vida. Assim, a alteração da fotoperiodicidade, alterando a sincronização do ritmo biológico materno contribui para a dessincronização dos ritmos das crias podendo leva-las a um consumo insuficiente de leite e perda de peso (REPERT, DUNCAN & GOLDMAN, 1985, MOORE, 1990, 1992, 1996, 1997).

Os filhotes de mães que foram pinealectomizadas ou foram submetidas à pinealectomia + secção de nervo óptico, estão sem informações quanto ao fotoperíodo do ritmo claro-escuro, uma vez que não têm como receber informações pela melatonina materna nem via núcleo supraquiasmático. Além disso, como seu núcleo supraquiasmático é ainda imaturo, a desorientação temporal em seus processos biológicos é fator importante na ruptura da homeostase, implicando em alterações em seus ritmos, principalmente o hormonal. Além de que, como já se mencionou anteriormente, a pinealectomia diminui os níveis de prolactina em ratos, alterando o comportamento materno e a produção basal de leite (RELKIN & ADACHI, 1972; REPERT, DUNCAN & GOLDMAN, 1985; NUMAN, 1994; ZITOUNI, PEVET & MASON-PEVET, 1996).

Associado a estes fatores o estresse materno maior no grupo de pinealectomia + secção de nervo óptico, provavelmente contribuiu para uma maior mortalidade na fase dos primeiros dias de vida.

É interessante observar que a principal via do controle do estresse, a secreção do fator liberador de corticotrofina, originário do núcleo

paraventricular, estimula a nível central, a secreção do hormônio adrenocorticotrófico pela hipófise. O fator de liberação de corticotrofina quando em concentrações ideais induzidas pelo estresse a nível do núcleo paraventricular participa na estimulação do hormônio adrenocorticotrófico e β -endorfinas nos tecidos hipofisários. A presença do fator de liberação de corticotrofina no núcleo paraventricular interliga funcionalmente o fator de liberação de corticotrofina, a ocitocina e a vasopressina. Tais ligações colocam o núcleo paraventricular como um dos locais da integração entre respostas autonômicas e as neuroendócrinas ao estresse que intervém no controle do comportamento de reprodução (LIU, B. et al., 1991; YEN, 1992; CORODIMAS, 1993; FORSELING et al., 1993; KALSBEECK et al., 1996; KENNAWAY, 1997).

Os filhotes machos dos grupos controle tem peso semelhante ao nascimento (tabela VI). Durante o experimento ocorreu variação no peso das crias, com aumento no 5º dia nas de operação simulada de pinealectomia, ocorrendo o mesmo no 14º dia. No desmame, crias de mães submetidas a operação simulada de secção de nervo óptico, tiveram peso menor que o controle de colônia. A variação ponderal menor dos filhotes submetidos as de operações simuladas possivelmente tem ligação ao estresse cirúrgico. Os maiores escores ponderais do grupo de operação simulada de pinealectomia pode ser explicado por variações próprias de cada grupo, ligadas a mãe e a características individuais mais adaptadas superando a injúria cirúrgica (KALSBEECK, 1996; JUSZCZAK, 1998).

A variação ponderal dos filhotes submetidos a luz constante mostra uma oscilação que repete o experimento de LEON (1985). Inicialmente tem peso maior ao nascimento e este peso ainda é mantido no 5º dia e no 14º. Essa diferença não tem explicação, exceto por características aleatórias. Porém no desmame tiveram seu peso reduzido em relação ao controle de colônia, esta perda estaria associada às alterações no comportamento materno, pois já foi relatado que o tempo de contato com a cria, apesar de não variar tanto, leva a ter filhotes menos pesados ao final do experimento. O efeito da luz constante também é sentido ao nível central uma vez que

inicialmente temos comprovada inibição do pulso de melatonina (MOORE, 1997), e liberação de β -endorfinas (JAFFE, 1990). A luz constante inibindo a liberação de melatonina e aumentando as β -endorfinas, levam a uma alteração na produção de prolactina, isto implica em alteração direta tanto no comportamento materno, como na produção de leite. O baixo escore ponderal final mostrou que não houve tempo para os filhotes recuperarem peso durante o intervalo observado. Filhotes de mães submetidas a pinealectomia não tiveram variações ao longo do experimento (tabela VI). Já o grupo submetido a secção de nervo óptico teve um comportamento de perda de peso, se comparado com seu controle, até o 5º dia de vida, uma vez que tais filhotes tiveram seu ritmo desregulado pela falta de informação materna quanto ao fotoperíodo (REPPERT, DUNCAN & GOLDMAN, 1985; JAFFE, 1990; YEN, 1990). No dia do desmame a situação inverteu-se com filhotes pesando menos, sem ter sido possível encontrar uma correlação que explicasse o fato.

Os filhotes de mães pinealectomizadas + secção de nervo óptico, apresentaram peso menor que as submetidas à operação simulada de pinealectomia + secção de nervo óptico. Como causa pode-se considerar o fator dessincronizador da mãe e das crias que altera os ritmos biológicos e a, alteração no comportamento materno com menor produção ou alteração na liberação de prolactina. Com o crescimento e amadurecimento dos filhotes, estes assumiram seu ritmo e ao iniciar alimentação com ração, se tornaram menos dependentes da mãe e conseqüentemente igualaram seu peso à média do controle (REPPERT, DUNCAN & GOLDMAN, 1985)).

No grupo controle os filhotes fêmeas não tiveram variação ponderal, exceto no grupo de ratas de operação simulada de secção de nervo óptico, que tiveram seu peso reduzido em relação ao controle de colônia, (tabela VII).

O comportamento de evolução ponderal dos filhotes fêmeas tem características semelhantes nos intervalos estudados, com a diferença apenas nas fêmeas submetidas à pinealectomia + secção de nervo óptico, que tiveram seu peso reduzido ao final do período de observação, em comparação com o grupo controle. A explicação para tais dados remete, novamente, à questão de

que em animais submetidos à pinealectomia + secção de nervo óptico, existe interrupção do principal fator de sincronização ou seja a informação fótica, associada a baixa produção de melatonina e alteração direta na liberação de prolactina e desmodulação de outros neurotransmissores. Além de um maior estresse que o grupo sofreu com o procedimento mais invasivo e prolongado (CHIODERA, et al., 1998; JUSZCZAK, 1998).

Do ponto de vista de consumo de leite em filhotes machos (tabela VIII), a ingesta foi menor nos grupos de pinealectomia e pinealectomia + secção de nervo óptico, sendo sentido aí o efeito do estresse sob a lactação (YEN, 1990, NAITOH et al., 1998), da supressão da informação fótica sobre a mãe e o efeito direto da pinealectomia sobre o processo lactacional com baixa produção de prolactina, afetando o consumo.

No grupo de luz constante, novamente temos resultados semelhantes a experimentos prévios (LEON, 1985), que relata que o fotoperíodo contínuo leva a inibição inicial da síntese de melatonina (BINKLEY, 1992), liberação de neurotransmissores antagônicos e alteração no comportamento materno (BINKLEY, 1992; CASSONE, 1992)

Em relação ao filhotes fêmeas houve menor ingesta também no grupo submetido à secção de nervo óptico, luz constante e pinealectomizados, (Tabela IX). Todos tiveram em comum a alteração na sincronização e informação do fotoperíodo, além de estarem submetidos a um estresse maior que seus controles (CASSONE, 1992; KALSBECK, 1996; JUSZCZAK, 1998).

A análise dos percentuais de filhotes que efetivamente ingeriram leite, aferido pela diferença de peso corporal antes e após 30 minutos de aleitamento, o os que não consumiram (diferença de peso, zero ou negativo), (COWIE & FOLLEY, 1947), mostra que entre os grupos de filhotes machos não houve diferenças significativas. Isto significa que o comportamento da cria no sentido de amamentação foi semelhantes. Entre as fêmeas somente o grupo, de operação simulada de secção de nervo óptico, mais filhotes deixaram de ingerir leite. A este achado não foi possível associar nenhum fator causal, sendo considerado casual.

Na avaliação do início da puberdade há evidências que o fotoperíodo influencia fortemente a maturação sexual, confirmando estudos prévios em ratos (DIAZ et al., 1995; FERNANDEZ et al., 1995).

A descida dos testículos foi o indicador do início da puberdade em machos. Em nenhum dos grupos houve descida antes do 14º dia, indicando que nenhum procedimento levou liberação de fatores que induzissem à puberdade precoce (quadro 2). Os grupos controles não têm diferença entre si a maioria dos animais teve seu início de puberdade em tempo semelhante ao de animais da colônia de onde se originaram (PETERS & GUERRA, 1996).. A secção de nervo óptico, suprimindo o estímulo fótico sobre o núcleo supraquiasmático e a liberação de melatonina, fez com que 42% de filhotes apresentassem descida de testículos entre 14 a 18 dias de vida, caracterizando a influência da estímulo materno para o início da puberdade dos filhotes, conforme estudos prévios (DIAZ, et al., 1995; FERNANDEZ et al., 1995).

As crias de mães submetidas a luz constante e pinealectomia + secção de nervo óptico, apresentam descida dos testículos após o 21º dia de vida, um atraso na puberdade de quase um dia, quando comparados aos controles, a outros grupos operados e com os dados históricos da colônia do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF (PETERS & GUERRA, 1996). Nos dois casos as mães não transmitem corretamente informações sobre o fotoperíodo, e não há controle do núcleo supraquiasmático do filhote. Em hamster, a partir do 15º dia de vida já ocorre resposta do sistema nervoso central ao fotoperíodo (REPPERT, DUNCAN & GOLDMAN, 1985). Se ocorrer o mesmo no rato, pode ser que ele sincronize sua puberdade independentemente do controle materno e que isso cause um retardo na puberdade. (REPPERT et al. 1985; DIAZ et al., 1995; FERNANDES et al., 1995; KENNAWAY & ROWE, 1995).

Quanto a abertura vaginal nos grupos controle de colônia e operações simuladas temos que, exceto pelos grupos de operação simulada, (que teve

metade dos animais com abertura vaginal ente 31 e 35 dias de vida e a outra metade entre 36 e 40 dias de vida) não houve diferença significativa entre os demais grupos (Quadro 3).

As ratas submetidas a luz constante e pinealectomia + secção de nervo óptico tiveram, em 100% dos casos atraso na abertura vaginal, que ocorreu, após 45 dias de vida. Tempo maior que o observado nos demais grupos e em comparação com o controle histórico da colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF (PETERS & GUERRA, 1996). O retardo no início da puberdade foi, provavelmente, induzido pela dessincronização do fotoperíodo a que estes filhotes foram expostos, alterando a sincronização exercida pela pineal nas glândulas sexuais. Além de, no caso de crias de mães que ficaram expostas a luz constante, o efeito direto sobre o ritmo circadiano da própria cria (REPERRT et al. 1985; DIAZ et al., 1995; FERNANDES et al., 1995; KENNAWAY & ROWE, 1995; NAITOH et al., 1998).

Resumindo os dados mais conspícuos obtidos no trabalho pode-se dizer que:

1. Os procedimentos cirúrgicos por si só são estressantes para as mães e para as crias elevando a taxa de mortalidade em ambas, sendo o mais lesivo destes a pinealectomia + secção de nervo óptico.
2. A duração da gestação é prolongada em um dia quando a rata tem seu nervo óptico seccionado.
3. A exposição à luz constante faz com que a mãe reduza o consumo de ração.
4. A exposição materna e das crias causou nas crias:
 - a) Redução do peso ao término do período de lactação.
 - b) Mortalidade maior em crias de ambos os sexos.
 - c) Menor consumo de leite.
 - d) Atraso na puberdade de machos e fêmeas.
5. A remoção da pineal materna causou entre as crias.
 - a) aumento da mortalidade entre machos e fêmeas.
 - b) Menor consumo de leite.
6. A secção de nervo óptico materno acarretou entre as crias.
 - a) Perda de peso, em machos no intervalo entre o 5º o 14º dia de vida pós-natal.
 - b) Menor consumo de leite entre fêmeas.

7. Associação de pinealectomia + secção de nervo óptico materno produziu as seguintes alterações.

- a) Maior índice de mortalidade entre fêmeas no intervalo do nascimento ao 5º dia de vida.
- b) Perda de peso de machos, no intervalo do 5º ao 14º dias de vida pós-natal e de fêmeas, e na época do desmame.
- c) Menor consumo de leite entre os machos.
- d) Atraso na puberdade de machos e fêmeas .

Tais dados concordam com a literatura, quando se infere que a mãe traduz o estímulo do fotoperíodo e este é importante para sincronizar os ritmos do feto e das crias na fase inicial da vida neo-natal, sendo a natureza do sinal materno veiculada pelos dois sistemas de sincronização ou seja, pela secreção de melatonina e via sistema nervoso autônomo pela sincronização mediada pelo núcleo supraquiasmático (REPERT, DUNCAN & GOLDMAN, 1985; HASTINGS, et al., 1985; JAFFE, 1990; MOORE, 1990; YEN, 1990; MOOSS & FREUND- MERCIER (1991); AXELROD, 1992, MOORE, 1992, MOORE 1996, MOORE 1997; DIAZ, et al. 1998).

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

1. A remoção da pineal, a secção do nervo óptico, a combinação de ambos procedimentos e a exposição à luz constante, reduziu a sobrevivência de crias e causou morte entre as mães. Parte dos efeitos devem-se ao ato cirúrgico *per se*.
2. A luz constante prolongou em um dia a duração da gestação o que evidencia que a fotoperiodicidade tem participação na sincronização do parto.
3. A pinealectomia + secção de nervo óptico induziu maior índice de mortalidade entre as crias nos 5 primeiros dias de vida enquanto que a exposição à luz constante o fez no intervalo de 6 a 14 dias. No primeiro caso supõe-se que tenha ocorrido um efeito cumulativo de estresse materno, associado à perda temporária do ritmo circadiano que posteriormente retornou. No segundo, a alteração da fotoperiodicidade parece ter efeito sobre mãe e cria, alterando a sincronização dos ritmos biológicos.
4. A mortalidade das crias pode ter sido consequência da redução do consumo de leite. Há indícios de que tal resultado não se deva ao comportamento da cria, em busca de alimento, mas sim por redução na produção de leite (síntese, secreção ou ejeção).
5. A desafereciação da via fótica materna pela pinealectomia, secção de nervo óptico ou a combinação de ambos, alterou a sincronização endógena materna, fetal ou ambas, acarretando mais mortalidade das crias e perda de peso, possivelmente por redução do consumo de leite. Tal redução provavelmente não se deve ao comportamento das crias, visto que o número das que mamaram e das que não mamaram foi semelhante.

Sugere-se que possa ter havido redução na produção de leite (síntese, secreção ou ejeção).

6. A puberdade de machos e fêmeas sofrem atraso em mães submetidas a pinealectomia + secção de nervo óptico e a luz constante, o que comprova a importância do fotoperíodo e da sincronização materna no processo de puberdade em ratos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYAMA, M, MORIYA, T, SHIBATA, S. Physiological, pharmacological and molecular aspects of mammalian biological clocks . *Nippon Yakurigaku Zasshi*. v. 112, n.4 p. 243-50, 1998.
- ANTÓN-TAY, FERNANDO. Pineal-Brain Relationships. In WOLSTENHOLME, G.E.W. & KNIGHT, JULIE . **The Pineal Gland**. London: Churchill Livingstone, 1971, p. 213-219.
- AXELROD, JULIUS. The pineal gland as a neuroendocrine transducer. **Discussion in Neuroscience**. v. VIII, n.2+3, p.52-3, 1992.
- BINKLEY, S. Structures and molecules involved in generation and regulation of biological rhythms in vertebrates and invertebrates. **Experientia**. v.49, n.8, p. 648-53, 1993.
- BONNEFOND, C., et al. The hypothalamus and photoperiodic control of FSH secretion by melatonin in the Syrian hamster. **J Endocrinol**. v.122, n.1, p. 247-54, 1989.
- BRIDGES, R.S., et al. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid treated, nulliparous female rats. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**. v. 87, n. 20, p. 8003-7, 1990
- BRODAL, A. **Anatomia Neurológica**, Com Correlações Clínicas. São Paulo: Roca, 1979. p. 563-573.
- BRONSON, F.H. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In KNOBILL, E. & NEILL, J. et al . **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p. 1831-1864.
- CASSONE, V.M. The pineal gland influences rat circadian activity rhythms in constant light. **J Biol Rhythms**. v.7, n.1, p.27- 40, 1992.
- CASSONE, V.M., et al. Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. **J. Biol Rhythms**. v.8 suppl. s 73-81, 1993.
- CARDINALI, DANIEL P., ROMEO, HORACIO E. Peripheral neuroendocrine interrelationships in the cervical region. **NIPS**. v. 5., p.100-104, 1990.
- CARDINALI, D.P., et al. Multifactorial control of pineal melatonin synthesis: An analysis through binding studies. In REITER, R.J. & FRASCHINI (Eds). **Advances in pineal research**. London: John Libbey & Co. 1987. p . 51-66.
- CHIASSON, R.B. Introduction, taxonomy. In _____ **Laboratory anatomy of the white rat**. New York: W.C.Brown, 1975. p. 1-2.

- CHIODERA, et al., Oxytocin enhances the prolactin response to vasoactive intestinal polypeptide in healthy women. **Fertility and Sterility**. v.70, n.3, p.541-3, 1998.
- COHEN, P.J. & DRIPPS, R.D. História e teorias da anestesia geral. In GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1967. p. 40-5.
- CORODIMAS, K.P., et al. Neurons in the lateral subdivision of the habenular complex mediate the hormonal onset of maternal behavior in the rats. **Behav. Neurosci**. v.107, n.5, p.827-43, 1993.
- COWIE, A.T. & FOLLEY, S.J. The measurement of lactational performance in the rat in studies of the endocrine control of lactation. **J. Endocrinology**. v.240, p. 380 – 381, 1947.
- CURLEWIS, J.D. Seasonal prolactin secretion and its role in seasonal reproduction: a review. **Reprod. Fertil. Dev**. v.4, n. 1, p. 1-23, 1992.
- DAWSON, D., van den HEUVEL, C.J. Integrating the actions of melatonin on human physiology. **Ann Med**. v.30, n.1, p.95-102, 1998.
- DIAZ, L.B. et al. Effect of pinealectomy and melatonin treatment during pregnancy on the sexual development of the female and male rat offspring. **Eur. J. Endocrinol**. v.132, n.6, p. 765-70, 1995.
- DRIPPS, R.D. Sinais e estádios da anestesia. In GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1967. p. 46-51.
- ESBERARD, C. A. **Neurofisiologia**. Rio de Janeiro: Campus, 1980. p. 511-535.
- FACTOR, E.M., MAYER, A.D., ROSENBLATT, J.S. Persistent effects on maternal aggression of pregnancy but not of estrogen/progesterone treatment of nonpregnant ovariectomized rats revealed when initiation of maternal behavior is delayed. **Horm. Behav**. v. 27, n1, p.132-5, 1993.
- FERNANDEZ, B., et al. Maternal pineal gland participates in prepubertal rats ovarian oocyte development. **Anat. Rec**. v. 243, n.4, 461-5, 1995.
- FORSELING, M.L., et al. The role of pineal in the control of the daily patterns of neurohypophysial hormone secretion. **J. Pineal Res**. v.14, n.1, p.45-51, 1993.
- GAUER, F., MASSON-PEVET, M. & PEVET, P. Melatonin receptor density is regulated in rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei by melatonin itself. **Brain Res**. v.602, n.1, p. 153-6, 1993.

- GILLETTE, M.U., McARTHUR, A.J. Circadian actions of melatonin at the suprachiasmatic nucleus. **Behav Brain Res.** v. 73, n.1-2, p. 135-9, 1996.
- GUERRA, M.O., et al. Pinealectomy and blindness during pregnancy in the rat. **American Journal of Obstetrics and Gynecology.** v. 115, n. 4, 1973.
- GUERRA, M.O. & ANDRADE, A.T.L. Pinealectomia durante a gestação de rata: efeito sobre os fetos. **Revista de ginecologia e D'obstetrícia.** v. 132 p. 101-103. 1975a.
- GUERRA, M.O. & ANDRADE, A.T.L. Efeito da pinealectomia sobre o sistema hipófise-ovariano de ratas grávidas. **Bol. Inst. Cie. Biol. Geo UFJF.** n.13 p. 3-8., 1975 b.
- GUYTON, A.C. **Textbook of medical physiology.** 5.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1976. p. 973-987.
- HASTINGS, M.H., et al. Melatonin and the brain in photoperiodic mammals. In EVERED, D. & CLARK, S. **Photoperiodism, melatonin and the pineal.** London: Pittman, 1985. p. 57-77.
- HILL, S.M., et al. Effects of melatonin on estrogen receptor expression in the forebrain ou outbred (Lak. Lvg) golden hamsters. **Brain Res.** v.742, n.1-2, p.107-14, 1996.
- HOFFMAN, R.A. & REITER, R.J. Rapid pinealectomy in hamster and other small rodents. **The Anatomical Record.** n. 153, p. 19, 1965
- JAFFE, R.B., Integração dos sistemas de controle endócrino materno-fetal. In YEN, S.S.C., JAFFE, ROBERT B. **Endocrinologia Reprodutiva.** São Paulo: Rocca, 1990. p. 733-749..
- JUSZCZAK, M. Melatonin affects the oxytocin and prolactin responses to stress in male rats. **J. physiol. Pharmacol.** v.49, n.1, p. 151-63, 1998.
- KALSBECK, A., et al. Gaba receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats are implicated in the control of melatonin and corticosterone release. **Neuroendocrinology.** v. 63, n.1, p.69-78, 1996.
- KENNAWAY, D.J. & ROWE, S.A. Melatonin binding sites and their role in seasonal reproduction. **J. Reprod. Fertil.** n. 49, p. 423-35, 1995.
- KENNAWAY, D.J. Light, neurotransmitters and the suprachiasmatic nucleus control of pineal melatonin production in the rat. **Biol Signals.** v.6, n4-6, p. 247-54, 1997.

- KLEIN, D.C. Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. In EVERED, D. & CLARK, S. **Photoperiodism, melatonin and the pineal**. London: Pittman, 1985. p. 38-56.
- KUMAR, V. Photoperiodism in higher vertebrates: an adaptive strategy in temporal environment. **Indian j. exp. Biol.** v.35, n.5, p. 427-37, 1997.
- LARSEN, P.J., ENQUIST, L.W. & CARD, J.P. Characterization Of The Multisynaptic Neuronal Control of the Rat Pineal Gland Using Viral Transneuronal Tracing. **European Journal of Neurosciences**. v.10, n.1, p. 128-145, 1998.
- LEANDER, P., VRANG, N., MOLLER, M. Neuronal projections from the mesencephalic raphe nuclear complex to the suprachiasmatic nucleus and the deep pineal gland in golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **J. com. Neurol.** v. 399, n. 1, 73-93, 1998.
- LEON, M. The effect of constant light on maternal physiology and behavior. **Physiology Behavior**. v. 34 n.4, 631-3, 1985.
- LIU, B., et al. The hypothalamus is not the origin of vasopressin and oxytocin in the rat pineal gland. **Neuroendocrinology**. v. 53, n.5, p.523-7, 1991.
- LIU, C, et al. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. **Neuron**. v.19, n.1, p. 91-102, 1997.
- MACHADO, A.B.M. **Neuroanatomia funcional**. 2.ed. São Paulo: Ateneo, 1993. p. 237-241.
- MASSON-PEVET, M. BIANCHI, L. PEVET, P. Circadian photic regulation of melatonin receptor density in rat suprachiasmatic nuclei: comparison with light induction of fos-related protein. **J. Neurosci. Res** . v.43, n.5, p. 632-7, 1996.
- MARTINET, L., ALLAIN, D. Role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproductive and non-reproductive functions in mink (*Mustela vison*). In EVERED, D. & CLARK, S. **Photoperiodism, melatonin and the pineal**. London: Pittman, 1985. p. 170-87.
- MAYER, A.D., ROSENBLATT, J.S. Effects of prolonged estrogen-progesterone treatment and hypophysectomy on the stimulation of short-latency maternal behavior and aggression in female rats. **Horm. Behav.** v. 24, n.2 p.152-73, 1990.
- MAYER, A.D., ROSENBLATT, J.S. Peripheral olfactory deafferentation of the primary olfactory system in rats using ZnSO₄ nasal spray with special reference to maternal behavior. **Physiol. Behav.** v. 53, n.3, p. 587-92, 1993.

- McCARTHY, M.M., CURRAN, G.H. & SIEGEL, H.I. Evidence of prolactin in the maternal behavior of the hamster. **Physiol. Behav.** v. 55, n.1, p.181-4, 1994.
- McNEILLY, Alan S. Suckling and the control of gonadotropin secretion. In KNOBILL, E. & NEILL, J. et al. **The physiology of reproduction.** New York: Raven Press, 1988. p. 2323-2341.
- MENAKER, M. Eyes – the second (and third) pineal glands? In EVERED, D. & CLARK, S. **Photoperiodism, melatonin and the pineal.** London: Pittman, 1985. p. 78-92.
- MENAKER, M., MOREIRA, L.F., TOSINI, G. Evolution of circadian organization in the vertebrates. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.30, n.3, p. 305-13, 1997.
- MOORE-EDE, M.C. & MOLINE, M.L. Circadian rhythms and photoperiodism. In EVERED, D. & CLARK, S. **Photoperiodism, melatonin and the pineal.** London: Pittman, 1985. p. 23-37.
- MOORE, R. Y. Mecanismos neuroendócrinos - células e sistemas. In YEN, Samuel S. C. & JAFFE, Robert B. **Endocrinologia reprodutiva.** São Paulo: Rocca, 1990. p. 3-27.
- MOORE, R.Y. The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. **Discussion in Neuroscience.** v. VIII, n.2+3, p.26-33, 1992.
- MOORE, R.Y. Neural Control of Pineal Gland. **Behavioral Brain Research.** Special volume – Serotonin. Complete volume. 73, n.1, p. 125-130, 1996.
- MOORE, R.Y. Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. **Annu Ver Med.** v.48, p. 253-66, 1997.
- MOOS, R.P. & FREUND-MERCIER, M.J. Central effects of oxytocin. **Physiol. Rev.** n. 71, p.331-70, 1991.
- MIZUNO, H., SEMURI, N. Lack of effects of melatonin administration and pinealectomy on the milk ejection response in the rat. **Endocrinologia Japonica.** v. 5, n.17, p. 417-20, 1970.
- NABOROODIRI, M. A. A., et al. Serum Melatonin and Pineal metabolism in a Species With Small Day/Night N-Acetyltransferase Rhythm. **Compendium of Biochemical Physiology.** Great Britain: Pergamon Press, 1985. p. 731-736.
- NAITOH, N., et al. Alteration by maternal pinealectomy of fetal and neonatal melatonin and dopamine D1 receptor binding in the suprachiasmatic nuclei. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 253, n3, p. 850-4, 1998.

- NUMAN, M. Maternal Behavior. In KNOBILL, E. & NEILL, J. et al. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1988 p. 1679-1692.
- NUMAN, M., McSPARREN, J., NUMAN, M.J. Dorsolateral connections of the medial preoptic area and maternal behavior in rats. **Behav. Neurosci.** v.104, n.6, p. 964-79, 1990.
- NUMAN, M. Long-term effects of preoptic area knife cuts on the maternal behavior of postpartum rats. **Behav. Neural Biol.** v.53, n.2, p. 284-90,1990.
- NUMAN, M.& NUMAN, M.J. Preoptic-brainstem connections and maternal behavior in rats. **Behav. Neurosci.** v.105, n.6, p.1013-29,1991.
- NUMAN, M. Maternal Behavior. In KNOBILL, E. & NEILL, J. et al. **The physiology of reproduction 2nd ed.** New York: Raven Press, 1994. p. 221- 302.
- OLIVEIRA, E. M.& ROCHA, J. B. T. Efeitos do tratamento crônico, durante a lactação, com cloreto de mercúrio sobre o peso corporal e atividade colinesterásica cerebral. **Saúde - Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Santa Maria.** UFSM- Santa Maria – RG. 1992. v18, n.3 p. 25- 29.
- PETERS, V. M., GUERRA, M.O. **Animais de Experimentação, Padrões Biológicos, Ratos.** Morfometria e dados sobre a reprodução de Ratos Wistar do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG. Juiz de Fora: Imprensa Universitária, 1996. p. 7-27.
- PRICE, H.L. & DRIPPS, R.D. Anestésicos gerais inalação. II. Anestésicos voláteis: Éter dietílico, clorofórmio, halotano, metoxiflurano e outros anestésicos halogenados voláteis. In GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1967. p. 78-92.
- RANSON, S.W. & CLARK,S.L. Anatomia del sistema nervioso. In _____. Diencefalo, epitalamo. México: Interamericana, 1963. p. 279-280.
- REDMAN, J.R., FRANCIS, A.J. Entrainment of rat circadian rhythms by the melatonin agonist s-20098 requires intact suprachiasmatic nuclei but not the pineal. **J. biol. rhythms** 1998 feb; 13(1): 39-51.
- REITER, R.J. The melatonin rhythm: both a clock and calendar. **Experientia.** v. 49, n.8, p. 654-64,1993.
- REITER, R.J. The pineal gland. In: De GLOT, et al. **Endocrinology.** Philadelphia: Saunders, 1983. 1:240. **apud** LIMA, M.F.P. et al.

- Desenvolvimento de policistose ovariana em ratas pinealectomizadas. **Reprod & Climat.** v.10, n.2, p. 73-75, 1995.
- REGHUNGANADAN, V., REGHUNGANADAN, R., MARYA, R.K. Vasopressin: its possible role in circadian time keeping. **Cronobiologia.** v.18, n1, p.39-47, 1991.
- RELKIN, R. & ADACHI, M. Effects of pinealectomy, constant light and plasma prolactin levels in the rat. **Federation Proceedings.** v.31, n.2, p. 811, 1972.
- REPERT, S.M. DUNCAN, M.J. & GOLDMAN, B.D. Photoc influences on the developing mammal. In EVERED, D. & CLARK, S. **Photoperiodism, melatonin and the pineal.** London: Pittman, 1985. p. 116-128.
- REUSS, S. Components and connections of the circadian timing system in mammals. **Cell Tissue Research.** v.285, n.3, p. 353-78, 1996.
- ROBERTS, M.R., XIE, S., MATHIALAGAN, N. Maternal recognition of pregnancy. **Biology of reproduction.** n. 54, p. 294-302, 1996.
- ROMEO, H.E., et al. Increase in adrenocorticotropin release during wallerian degeneration of peripheral sympatectic neurons after superior cervical gangliectomy of rats. **Neuroendocrinology.** v.51, n.2, p. 213-8, 1990.
- SANDYK, R. The pineal gland and the menstrual cycle. **International Journal of Neurosciences.** v.63, n.3-4, p.197-204, 1992.
- SHEPHARD, R.J. & SHEK, P.N. Interations between sleep, other body rithms, immune response and exercise. **Canadian Journal of Application Phisyology.** v.22, n.2, p. 95-116, 1997.
- SHORT, R.V. Photoperiodism, melatonin and thr pineal: it's only a question of time. In EVERED, D. & CLARK, S. **Photoperiodism, melatonin and the pineal.** London: Pittman, 1985. p. 1-8.
- SIZONENKO, P.C. et al. The pineal and pubertal development. In EVERED, D. & CLARK, S. **Photoperiodism, melatonin and the pineal.** London: Pittman, 1985. p. 208-230.
- SORRENTINO, S., JAN, S., SCHALCH, D. Pineal regulation of growth hormone production and secretion in blinded and blinded anosmic rats. **The Anatomical Record.** v. 166 (2), p. 382, 1970.
- SORRENTINO, S., et al. Underfeeding on reproductive organ size and radioimunoassayable growth hormone. **Neuroendocrinology.** v.7, p. 105-115, 1971.

- STERN, J.M., JOHNSON, S.K. Perioral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology**. v.103, n.3, p. 269-80, 1989.
- STERN, J.M., KOLUNIE, J.M.. Perioral anesthesia disrupts maternal behavior during early lactation in Long-Evans rats. **Behav. Neural Biol.** v. 52, n.1, p. 20-38, 1989.
- TECLEMARIAM-MESBAH, R., et al. Oxytocin innervation of spinal preganglionic neurons projecting to the superior cervical ganglion in the rat. **Cell Tissue Res.** v. 287, n.3, p. 481-6, 1997.
- THIEBLOT, L. Sur des fonctions Glandulaires de l'éphiphyse. **Journal de Physyologie**. v.39, n.3, p. 321-330, 1947.
- THIEBLOT, L., BERTHELAY, J., BLAIRE, S. Action de la melatonine sur la secretion gonadotrofe du rat. **Société de Biologie Clermond-Fernand**. n. 160, p. 2306-2309, 1966.
- TUREK, F.W.& van CAUTER, E. R. Rhythms and reproduction. In KNOBILL, E. & NEILL, J. et al. **The Phisology of The Reproduction**. New York: Raven Press, 1988 p. 1789-1830.
- VANDENBERGH, J.G. Pherormones and mammalian reproduction. In KNOBILL, E. & NEILL, J. et al. **The Phisology of The Reproduction**. New York: Raven Press, 1988 p. 1679-1692.
- VANECEK, J. Mechanism of melatonin action. **Physiol Res.** v.40, n.1, p.11-24, 1991.
- VILLEE, C. A., WALKER, W. F., BARNES, R. D. **Zoologia Geral**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985. p. 609-618.
- VOLLRATH, L. Mammalian pinealocytes: ultrastructural aspects and innervation. In EVERED, D. & CLARK, S. **Photoperiodism, melatonin and the pineal**. London: Pittman, 1985. p. 9-22.
- VUILLEZ, P., et al. Effect of NMDA receptor antagonist MK-801 on light-induced Fos expression in the suprachiasmatic nuclei and on melatonin production in the syriam hamster. **J. neuroendocrinol.** v.10, n.9, p. 671-7, 1998.
- WALLEN, E.P., et al. Photoperiodic reponse in the male laboratory rat. **Biology of Reproduction**. v.37, p. 22-27, 1987.
- WAKERLEY, J.B. , CLARKE, G., SUMMERLEE, A.J.S. Milk ejection and its control, In KNOBILL, E. & NEILL, J. et al. **The phisiology of the reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p. 2284-2316.

- WAYNFORTH, H.B. Pinealectomy . **Experimental and surgical technique in the rat.** London: Academic Press, 1980. p. 175.
- WOOLLMAN, H. & DRIPPS, R.D. Captação, distribuição, eliminação e administração dos anestésicos por inalação. In GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1967. p. 57-65.
- WURTMAN, R. J., AXELROD, J. & KELLY, D. E. Light, the pineal and biological rhythms. In _____ **The Pineal Gland.** New York: Academic Press, 1968. p. 108-126.
- WURTMAN, R. J., AXELROD, J. & CHOU. Melatonin a pineal substance – its effect on the rat ovary. **Science.** n. 141, p. 227-8, 1963. **Apud AXELROD, JULIUS.** The pineal gland as a neuroendocrine transducer. **Discussion in Neuroscience.** v. VIII, n.2+3, p.52-3, 1992.
- YEN, SAMUEL S.C.. Prolactina na reprodução humana. In YEN, S.S.C., JAFFE, ROBERT B. **Endocrinologia Reprodutiva.** São Paulo: Rocca, 1990. p. 229-246.
- ZITOUNI, M., PEVET, P & MASSON-PEVET, M. Brain and pituitary melatonin receptor in male rat during post-natal and pubertal development and the effect os pinealectomy and testosterone manipulation. **Journal of endocrinology.** v.8, n.8, p. 571-7,1996.