



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**Manipulação neonatal, ocitocina, vasopressina e  
comportamentos sociais em ratos**

**Anelise S. Todeschin**

**Agosto de 2008**



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**Manipulação neonatal, ocitocina, vasopressina e  
comportamentos sociais em ratos**

*Tese apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Fisiologia, da  
Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul, como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Doutor em  
Ciências Biológicas: Fisiologia.*

**Anelise S. Todeschin**

**Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion**

## AGRADECIMENTOS

Ao orientador, professor Aldo Lucion, pelo exemplo de profissionalismo, dedicação, ética, e pela oportunidade.

A professora Maria Flavia Ribeiro, pelos experimentos, uso de seu laboratório, profissionalismo, dedicação e interesse.

Ao professor Celso Franci (USP), por disponibilizar o acesso aos radioimunoensaios em seu laboratório.

A professora Marilda (UCSPA, ex FFFCMPA), que foi parte importante dos experimentos de imunistoquímica.

A professora Matilde Achaval que muitas vezes esclareceu dúvidas.

Ao Dr. Hal Gainer (NIH, EUA), pela gentil doação dos anticorpos específicos.

A Helena Jacob, pelo auxílio em parte dos experimentos, paciência para refazer várias vezes, e que se tornou amiga.

Aos colegas e amigos que me ajudaram diretamente em partes dos experimentos Gabriela Severino, Silvana Jacobs, Everson e Elisa Winkelmann-Duarte.

Aos colegas de laboratório que me auxiliaram muitas vezes e que se tornaram amigos, Tatiane Camozzato, Charlis Raineki, Caroline Perinazzo, Márcia Scherem, Marcio Donadio, Marcelo Souza, Ana Raquel Karkow, Natalia Uriarte, Lígia Centenaro, Osni Gonçalves, Marcelo Herberts, Karin Weissheimer.

Aos bolsistas Bruno Aranda e Vanise Sebben, pela amizade, disponibilidade e que se não fosse pelo auxílio deles não teria conseguido.

A bioterista Ângela pelo cuidado com os animais.

As secretárias do PPG-Fisiologia, Fabiana, Alice e Uira.

A todos os professores da Pós-Graduação-Fisiologia, e ao programa pela oportunidade de poder fazer este curso.

Aos meus pais, Elisa e Waldacyr (*in memorian*), pelo carinho, pelo exemplo de caráter e por sempre me incentivarem em tudo e me deram a oportunidade de poder estudar.

Muito obrigado.

Dedico esta tese ao meu pai, pois sei que gostaria de tê-la visto pronta.

# Índice

CAPÍTULO 1-EFEITOS DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE OS COMPORTAMENTOS SOCIAIS EM RATOS ADULTOS.....		1
INTRODUÇÃO.....		2
Manipulação Neonatal.....		2
Memória social.....		6
Interação social.....		7
JUSTIFICATIVA.....		9
OBJETIVOS.....		9
MATERIAL E MÉTODOS .....		10
Animais .....		10
Manipulação Neonatal .....		10
Experimento 1-Memória social .....		11
Experimento 2-Interação social.....		13
Análise Estatística.....		14
RESULTADOS .....		16
Experimento 1- Memória Social.....		17
Experimento 2-Interação Social.....		19
DISCUSSÃO.....		25
CONCLUSÕES.....		28
CAPÍTULO 2-EFEITOS DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A LIBERAÇÃO PERIFÉRICA E SOBRE A PRODUÇÃO CENTRAL DA OCITOCINA.....		29
INTRODUÇÃO.....		30
Ocitocina.....		30
JUSTIFICATIVA.....		35
OBJETIVOS. ....		35
MATERIAL E MÉTODOS .....		36
Animais .....		36
Manipulação neonatal.....		36
Experimento 1.....		37
Experimento 2.....		38
Experimento 3.....		39
Experimento 4.....		40
Análise Estatística.....		40

RESULTADOS .....	42
Experimento 1.....	42
Experimento 2.....	44
Experimento 3.....	46
Experimento 4.....	53
DISCUSSÃO.....	55
CONCLUSÕES.....	58

CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A LIBERAÇÃO PERIFÉRICA E SOBRE A PRODUÇÃO CENTRAL DA VASOPRESSINA.....60

INTRODUÇÃO.....	61
Vasopressina.....	61
JUSTIFICATIVA.....	64
OBJETIVOS:.....	64
MATERIAL E MÉTODOS .....	65
Experimento 1.....	65
Experimento 2.....	65
Experimento 3.....	66
Experimento 4.....	67
Análise Estatística.....	68
RESULTADOS.....	69
Experimento 1.....	69
Experimento 2.....	71
Experimento 3.....	72
Experimento 4.....	80
DISCUSSÃO.....	83
CONCLUSÕES.....	87

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89
----------------------------------	----

ANEXOS .....	106
--------------	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS

αMSH - hormônio estimulador do alfa -melanócito

5 HT - 5 hidróxitriptamina, serotonina

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

ADH - hormônio antidiurético

ANOVA - análise de variância

CRH - hormônio liberador de corticotrofinas

EPM - erro padrão da média

FSH - hormônio folículo-estimulante

GH - hormônio do crescimento

GnRH - hormônio liberador de gonadotrofinas

HPA - eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

HNH - eixo hipotálamo neuro-hipófise

i.p. - intraperitoneal

LC - *locus coeruleus*

LH - hormônio luteinizante

ME - eminência mediana

NA - noradrenalina

OT - ocitocina

OTA - antagonista para o receptor de ocitocina

PVN - núcleo paraventricular do hipotálamo

SNC - sistema nervoso central

SON - núcleo supraóptico do hipotálamo

VP - vasopressina

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do protocolo de memória social.....	12
<b>Figura 2.</b> Foto ilustrativa da arena de interação social.....	14
<b>Figura 3.</b> Duração do comportamento de cheirar em ratos machos não-manipulados e manipulados no período neonatal, adultos, sem experiência sexual, sendo o mesmo juvenil apresentado por quatro sessões de 2 min intercaladas por 18 minutos (S1-S4); seguido por uma sessão com um juvenil diferente (S5).....	18
<b>Figura 4.</b> Duração do comportamento de cheirar em ratos não-manipulados e manipulados no período neonatal, adultos, com experiência sexual, sendo o mesmo juvenil apresentado por quatro sessões de 2 min intercaladas por 18 minutos (S1-S4); seguido por uma sessão com um juvenil diferente (S5).....	19.
<b>Figura 5.</b> Duração do comportamento de cheirar em ratas não-manipuladas e manipuladas no período neonatal, adultas, em diestro, sendo o mesmo juvenil apresentado por quatro sessões de 2 min intercaladas por 18 minutos (S1-S4); seguido por uma sessão com um juvenil diferente (S5).....	20
<b>Figura 6.</b> Latência do comportamento de cheirar em ratos adultos, machos e fêmeas, não-manipulados e manipulados no período neonatal, no teste de interação social.....	21
<b>Figura 7.</b> Duração do comportamento de cheirar em ratos não-manipulados e manipulados no período neonatal, no teste de interação social.....	22
<b>Figura 8.</b> Duração e frequência do comportamento de atacar em ratos adultos, não-manipulados (NM) e manipulados (M) no período neonatal, no teste de interação social.....	23
<b>Figura 9.</b> Tempo em que os animais permaneciam em territórios diferentes, no teste de interação social.....	24
<b>Figura 10.</b> Ocitocina plasmática em filhotes machos e fêmeas, aos 10 dias de idade.....	43
<b>Figura 11.</b> Concentração plasmática de OT em ratos adultos conscientes, submetidos ao estresse por contenção.....	45
<b>Figura 12.</b> Número de células magnocelulares imunorreativas à OT por secção de cérebro, no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos adultos.....	47
<b>Figura 13.</b> Número de células parvocelulares imunorreativas à OT por secção de cérebro, no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos adultos.....	48

<b>Figura 14.</b> Número de células imunorreativas à OT por secção de cérebro, no núcleo supraóptico do hipotálamo de ratos adultos.....	49
<b>Figura 15.</b> Número de células magnocelulares imunorreativas à OT por secção de cérebro, no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratas adultas.....	50
<b>Figura 16.</b> Número de células magnocelulares imunorreativas à OT por secção de cérebro, no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratas adultas.....	51
<b>Figura 17.</b> Número de células imunorreativas à OT por secção de cérebro, no núcleo supraóptico do hipotálamo de ratas adultas.....	52
<b>Figura 18.</b> Expressão de OT no núcleo paraventricular de ratos adultos. Figura representativa dos <i>western blots</i> para OT. ....	54
<b>Figura 19.</b> Vasopressina plasmática em filhotes aos 10 dias de idade.....	70
<b>Figura 20.</b> Concentração plasmática de VP em ratos adultos conscientes, submetidos ao estresse por contenção. ....	72
<b>Figura 21.</b> Número de células magnocelulares imunorreativas à VP por secção de cérebro, no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos adultos.....	74
<b>Figura 22.</b> Número de células parvocelulares imunorreativas à VP por secção de cérebro, no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos adultos.....	75
<b>Figura 23.</b> Número de células imunorreativas à VP por secção de cérebro, no núcleo supraóptico do hipotálamo de ratos adultos .....	76
<b>Figura 24.</b> Número de células magnocelulares imunorreativas à VP por secção de cérebro, no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratas adultas.....	77
<b>Figura 25.</b> Número de células parvocelulares imunorreativas à VP por secção de cérebro, no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratas adultas.....	78
<b>Figura 26.</b> Número de células imunorreativas à VP por secção de cérebro, no núcleo supraóptico do hipotálamo de ratas adultas .....	79
<b>Figura 27.</b> Expressão de VP no núcleo paraventricular de ratos adultos. Figura representativa dos <i>western blots</i> para VP.. ....	81
<b>Figura 28.</b> Foto em menor aumento (20X), demonstrando neurônios imunorreativos a VP, no PVN. Esta foto refere-se a um rato macho não-manipulado.....	82
<b>Figura 29.</b> Foto em menor aumento (20X), demonstrando neurônios imunorreativos a VP, no SON. Esta foto refere-se a um rato macho não-manipulado.....	83

## **Resumo**

## **Manipulação neonatal, ocitocina, vasopressina e comportamentos sociais em ratos**

Eventos que acontecem aos filhotes, tais como intervenções no ambiente ou alterações no comportamento materno, durante o período neonatal induzem a alterações neuroendócrinas e comportamentais estáveis, percebidas já na infância e perduram na vida adulta do animal. O modelo de manipulação dos filhotes no período neonatal tem sido estudado com o objetivo de tentar compreender as alterações no ambiente perinatal e suas manifestações, visto que muitas patologias psicológicas podem ser desencadeadas neste período e se manifestar na vida adulta. A principal consequência da manipulação neonatal é uma redução da ansiedade a ambientes novos em ratos adultos. Logo após o nascimento, o sistema nervoso central (SNC) ainda está em formação e intervenções ocorridas no período neonatal afetam alguns sistemas neurais.

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da manipulação durante os primeiros dias de vida, em filhotes de rato e suas consequências em comportamentos sociais e em sistemas neurais relacionados à ocitocina e vasopressina. A ocitocina, um hormônio neuro-hipofisário cujo papel na reprodução é bem conhecido foi estudado neste trabalho porque tem funções importantes no SNC, principalmente em modular comportamentos, como sexual, social, afetivos e memória social. A vasopressina, conhecida por sua função na manutenção da osmolalidade, também é reconhecida por modular agressividade, o eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal, comportamentos sexuais, memória e tem sido estudada em transtornos depressivos. Este estudo comparou vários parâmetros relacionados à produção e à liberação de ocitocina e vasopressina entre ratos manipulados e não-manipulados no período neonatal.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram uma reduzida interação social em ratos adultos. Ainda pôde-se observar aumento da agressividade nestes animais. Esse efeito comportamental aparentemente é dependente do sexo, pois somente foi detectado em machos. Também foi relatado um menor número de neurônios ocitocinérgicos e um aumento no número dos vasopressinérgicos no hipotálamo de ratos adultos, machos e fêmeas, que sofreram manipulação. Não foi demonstrada diferenças na liberação destes hormônios na resposta ao estresse, nem na expressão total de ocitocina e de vasopressina no núcleo paraventricular de ratos adultos. Entretanto, em filhotes machos e fêmeas, aos 10

dias de idade, pôde-se observar que a manipulação aumenta a secreção plasmática de ocitocina.

Conclui-se assim, que, a manipulação no período neonatal interfere negativamente no estabelecimento de relações sociais na vida adulta, podendo ter como causa uma possível alteração nos sistemas ocitocinérgico e vasopressinérgico central nestes.

## CAPÍTULO 1

# EFEITOS DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE OS COMPORTAMENTOS SOCIAIS EM RATOS ADULTOS

## INTRODUÇÃO

### A manipulação neonatal

Os primeiros dias de vida de um indivíduo, principalmente nos mamíferos, são de crucial importância para que haja um desenvolvimento completo e pleno de sistemas neurais. Sabe-se que logo após o nascimento o sistema nervoso central (SNC) está ainda em formação, processo que pode durar anos em humanos e semanas em roedores (Fenoglio et al, 2006). Eventos que interferem no ambiente do neonato podem levar a alterações importantes na formação normal do SNC.

Muitas patologias que se manifestam na vida adulta podem ser desencadeadas na infância, por eventos considerados traumáticos e estressantes. Por exemplo, o abuso e a negligência à prole podem desestabilizar a fisiologia normal do organismo naquele período, podendo induzir a transtornos depressivos ou mesmo doenças cardiovasculares (Kaffman & Meaney, 2007; Swain et al, 2007).

Durante o desenvolvimento são necessários níveis adequados de glicocorticóides para a maturação normal do animal. Em ratos, durante o período neonatal até aproximadamente o 14º dia de vida os níveis de glicocorticóides permanecem baixos, e o filhote apresenta o eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal (HPA) imaturo, incapaz de responder adequadamente aos estímulos estressantes. A mãe participa na regulação dos sistemas fisiológicos da prole, entre eles o da manutenção dos níveis de hormônio do crescimento (GH), frequência cardíaca, ciclos de vigília, etc. Aparentemente a presença da mãe é necessária para que o eixo HPA mantenha-se suprimido durante os primeiros dias de vida, pois animais que ficam em separação prolongada da mãe respondem com ativação deste eixo, apresentando liberação de corticosterona (para revisão, Levine, 2001). A atividade do eixo HPA na vida adulta é determinada durante o período neonatal, incluindo o cuidado maternal (Meaney et al, 2007).

Há várias décadas vêm sendo estudados os efeitos da manipulação neonatal sobre comportamentos de ratos adultos. Ratos manipulados do primeiro ao 20º dia de vida e submetidos ao teste do campo aberto quando adultos, apresentam um aumento da locomoção neste teste. Ainda, apresentam uma redução significativa dos níveis plasmáticos de corticosterona comparados aos animais que não sofreram manipulação (Levine et al, 1967). A menor reatividade ao estresse parece ocorrer desde o período do desmame, pois ratos com 21

dias submetidos à manipulação do 1° ao 21° dia de nascimento, apresentam níveis reduzidos de corticosterona plasmática após choque elétrico em relação a animais não manipulados submetidos ao mesmo tipo de estresse (Ader et al, 1968). Os níveis de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) também são mais altos em ratos não-manipulados após alguns tipos de estresse (Meaney et al, 1993).

Somando-se a estes resultados, foi demonstrado que os animais manipulados, quando adultos apresentam medo diminuído em exposição a ambientes novos (Caldji et al, 2000). Ratos, machos e fêmeas, manipulados do primeiro ao décimo dia e submetidos quando adultos ao campo aberto com predador (gato) apresentam comportamentos indicativos de menor ansiedade em ambientes aversivos. O índice de locomoção se manteve significativamente maior em relação aos ratos não-manipulados tanto antes, durante e após a presença do predador na arena. Os ratos manipulados ainda apresentaram maior tempo na área do gato (Padoin et al, 2001).

A menor amplitude da secreção de corticosterona em resposta ao estresse em ratos manipulados pode ser devido a maior sensibilidade do *feedback* negativo do eixo HPA, pois foi demonstrado uma maior densidade de receptores para glicocorticóides no hipocampo destes animais. Sendo que o hipocampo, além do hipotálamo é uma importante região inibidora da síntese do hormônio liberador da corticotrofina (CRH) e da atividade do eixo HPA (Meaney et al, 1993).

Foram observadas alterações importantes em neurotransmissores, que também sofrem influência de variações no ambiente neonatal. Ratos manipulados apresentaram alterações nos níveis de dopamina e serotonina (5HT). Em diferentes áreas do SNC, houve aumento dos níveis de 5HT no hipocampo e aumento do metabolismo da dopamina no hipotálamo. Estas alterações foram observadas em ratos pré-púberes e na idade adulta, tanto nos níveis basais como induzidos por estresse (Papaioannou et al, 2002a).

Ratas manipuladas quando adultas apresentam ciclos estrais anovulatórios (Gomes et al, 1999) e uma diminuição da concentração plasmática de estradiol durante o proestro, bem como ausência do pico de LH, apesar de apresentarem ciclos estrais completos, compostos por quatro fases (Gomes et al, 2005).

Sugere-se que a manipulação neonatal dos filhotes possa induzir alterações no comportamento maternal, sendo um importante mediador, causando desta forma, as mudanças neuroendócrinas e comportamentais observadas na vida adulta do indivíduo. Desde que a manipulação neonatal induz a mudanças fisiológicas no filhote e ainda altera o comportamento da mãe, não está claro ainda qual dos dois fatores se a manipulação ou o comportamento

maternal são os responsáveis pelas alterações relatadas. A hipótese mais provável é a de que se devam ao comportamento maternal, pois quando o aumento do comportamento maternal é bloqueado após a manipulação, não ocorre o efeito da manipulação no comportamento exploratório (Kaffman & Meaney, 2007).

Os filhotes de mamíferos nascem quase que completamente dependentes do comportamento parental, principalmente do comportamento maternal, que visa nutrir, aquecer e prover contato físico para a maturação completa dos filhotes até que eles possam sobreviver sozinhos. Em ratos, o ambiente logo após o nascimento é composto da mãe e dos irmãos. A mãe constrói um ninho onde mantém os filhotes aquecidos e durante os primeiros dias pós-parto ela raramente afasta-se deste ninho (Numan, 1988, Swain et al, 2007). O comportamento da mãe durante o período pós-parto é adaptado para os cuidados do recém nascido. Em maior grau, ocorrem comportamentos como a hipervigilância, e obsessividade que pode melhorar e garantir a saúde e sobrevivência do recém nascido. As ligações sociais que se formam neste período ativam sistemas neurais que fazem com que a mãe naquele momento focalize no bem-estar do recém nascido. Alterações nesta relação, por exemplo, ruptura da ligação mãe-filhote, como a separação, podem induzir ao comportamento parental perturbado, como abuso ou negligência (Swain et al, 2007). Em roedores, os filhotes podem perceber a ausência prolongada da mãe e realizar respostas adaptativas como vocalizações e liberação de ACTH e corticosterona visando mobilizar os suprimentos de glicose para o cérebro na possível falta de alimentação aquele período (Kaffman & Meaney, 2007).

Em ratos, após uma interferência, ocorre uma alteração do comportamento maternal para com os filhotes. Por exemplo, mães cujos filhotes são submetidos à manipulação aumentam a duração do comportamento de amamentação com o dorso arqueado (Pryce et al, 2004). Após a manipulação, a mãe também aumenta a quantidade de estímulos para com os filhotes (para revisão, Fenoglio et al, 2006 b). Além disso, a separação dos filhotes por um longo período induziu ao aumento do comportamento de lambar (Pryce et al, 2004). Sendo assim, a manipulação ou estimulação neonatal pode ser considerada um indutor do comportamento maternal.

Desta forma, alterações no comportamento maternal podem induzir modificações epigenéticas nos filhotes. A estimulação táctil oriunda da mãe durante a primeira semana de vida parece ter uma importante função em estabelecer fenótipos estáveis no comportamento da ninhada (Kaffman & Meaney, 2007). Mães que naturalmente possuem maior cuidado maternal com a prole induziram nos filhotes várias alterações neuroendócrinas na vida adulta. Os filhotes de mães com alta frequência de lambar os filhotes mostraram menor desinibição no

campo aberto (Uriarte et al, 2007), maior densidade de receptores para benzodiazepínicos no núcleo central e lateral da amígdala, e no locus coeruleus (LC), bem como aumento de receptores beta adrenérgicos no LC em comparação com filhotes cujas mães apresentavam um índice de comportamento maternal significativamente menor (Caldji et al, 1998). Também foi relatado um aumento na metilação do gene para receptor de glicocorticóide no hipocampo, que é um dos componentes que controlam a expressão gênica do receptor para glicocorticóides. Estes resultados demonstraram que variações no ambiente do recém nascido na primeira semana de vida podem induzir alterações em níveis genômicos (Weaver et al, 2004). Ainda foi relatado um aumento na sinaptogênese hipocampal em ratos criados por mães com alta frequência do comportamento de lambar (Liu et al, 2000).

Foi reportado um prejuízo da função reprodutiva nestes animais. Ratas adultas apresentaram menor intensidade de lordose e uma redução significativa no número de oócitos liberados quando criadas por mães com maior frequência do comportamento de lambar (Uriarte et al, 2007).

O estresse pode ser definido como uma ameaça em potencial que pode ser originado de fora do organismo e que desencadeia uma cascata de reações que induzem a respostas rápidas e adaptativas, como a secreção de glicocorticóides e catecolaminas, mas também mudanças na expressão gênica (para revisão, Fenoglio et al, 2006a).

O estudo dos estímulos que são estressantes na infância e suas conseqüências é de extrema importância, visto que aproximadamente 50% das crianças sofrem algum tipo de estresse, como negligência ou abuso. Tais eventos atingem a saúde do sistema nervoso central, podendo prejudicar elementos cognitivos e emocionais e tem efeitos duradouros, manifestando-se principalmente durante a vida adulta do indivíduo (Fenoglio et al, 2006 a).

## **Sistema Olfatório**

Os animais com grande capacidade olfativa geralmente se utilizam de sinais olfatórios para a discriminação entre ameaça ou perigo, familiares ou não familiares e para discernir os alimentos. Em condições naturais, os ratos utilizam o comportamento de cheirar como padrão de comportamento exploratório (Kepecs et al, 2006). Em presas, como roedores, os sinais olfatórios, bem como auditivos, dos predadores possibilitam a detecção destes (para revisão, Apfelbach et al, 2005). Os estímulos olfatórios são moléculas que ligam-se a receptores específicos no epitélio nasal. Durante a respiração passiva, o fluxo de ar, contendo moléculas odoríferas é levado até o epitélio nasal e as moléculas ligam-se de maneiras diferentes aos

receptores localizados na mucosa nasal. Durante o cheirar ativo, que ocorre quando os roedores exploram ambientes novos ou estão em comportamentos de aprendizado olfatório, o fluxo de ar se altera dramaticamente. Neurônios sensoriais projetam para os glomérulos do bulbo olfatório, ativando diferentes regiões deste (para revisão, Johnson & Leon, 2007). Nos mamíferos o sistema olfatório tem a capacidade de discriminar milhares de estímulos químicos diferentes. Os estímulos se dividem em dois grupos: substâncias químicas não-voláteis presentes nos líquidos, os feromônios, e uma grande variedade de substâncias químicas voláteis presentes no ar. Esses estímulos são percebidos por dois sistemas olfatórios diferentes, o acessório e o principal (Holy, 2003, Keverne, 2004, Sánchez-Andrade et al, 2005).

### **Memória social**

Os comportamentos sociais requerem dois ou mais indivíduos e que os animais neste contexto tenham o instinto e a motivação para permanecerem próximos. Os comportamentos sociais podem ser considerados positivos, que incluem os afiliativos onde ocorrem benefícios mútuos ou os comportamentos sociais negativos, onde se encaixa o comportamento agressivo. As ligações sociais podem se formar entre pais e filhotes, entre dois adultos ou entre outros membros do grupo e possuem várias vantagens, entre elas a de garantir a sobrevivência da espécie e a de defesa contra a predação (Carter & Keverne, 2002).

Entre os mamíferos, existem espécies que vivem em diversos graus de sociabilidade, desde solitários até altamente sociais, como chimpanzés e humanos. Devido a característica humana de pertencerem ao grupo de alta sociabilidade, parece importante estudar os mecanismos associados aos relacionamentos sociais (Choleris et al, 2004).

O reconhecimento social (também conhecido como memória social) em que animais identificam e reconhecem indivíduos da mesma espécie é um pré-requisito para vários tipos de comportamentos sociais, porque permite o estabelecimento de ligações sociais e de hierarquias dentro de um grupo (Choleris et al, 2004). A formação de pares sociais e os comportamentos reprodutivos, também dependem da capacidade de reconhecer indivíduos familiares e não familiares, dentro da mesma espécie (para revisão, Ferguson et al, 2002).

O reconhecimento social nos roedores apresenta-se como um comportamento que utiliza o instinto natural dos roedores em investigar indivíduos novos, e avalia o aprendizado e a memória nos animais. Nestes animais, além da memória social de longo prazo, eles também

apresentam memória social de curto prazo, onde reconhecem animais apresentados por um breve período de tempo (Ferguson et al, 2002). Os comportamentos de cheirar o corpo e a região anogenital bem como perseguir o novo indivíduo são considerados comportamentos de investigação social (Bielsky & Young, 2004). Existem vários modelos experimentais utilizados para se testar a memória social, no modelo habituação-desabituação apresenta-se repetidamente o animal estímulo, que pode ser um juvenil pré-púbere, e a diminuição do tempo de investigação representa que houve um reconhecimento (Bielsky & Young, 2004).

O sistema olfatório principal e o sistema olfatório acessório são ativados durante os encontros sociais nos ratos. Os comportamentos apresentados durante esse teste, o cheirar o corpo e também perseguir o animal estímulo, indicam que não somente sinais olfatórios voláteis são utilizados para a discriminação, bem como sinais feromonais, não voláteis (Ferguson et al, 2002). O comportamento de investigação olfatória inclui o cheirar ativo e pode ser acompanhado de mordiscar e lambe (Kepecs et al, 2005).

Os mecanismos neurotransmissores envolvidos na memória social incluem a ocitocina e a vasopressina. Estes neuropeptídeos quando liberados em determinadas regiões do SNC são cruciais para que haja o reconhecimento social. O estrogênio também regula a ação da ocitocina na memória social em ratas fêmeas (Choleris et al, 2004). A ocitocina também é liberada em várias regiões do SNC durante interações sociais e sexuais (Carter & Keverne, 2002).

### **Interação social**

Quando dois ratos adultos são colocados juntos eles engajam-se em interações sociais, que incluem vários comportamentos, entre eles cheirar, perseguir, morder e algumas vezes apresentam comportamentos agressivos, tais como morder, chutar e boxear ou mesmo podem apresentar comportamento de montar (File & Hyde, 1978). Em ratos, os comportamentos sociais incluem cheirar o corpo e região genital, o lutar de brincadeira (*play fighting behavior*), que inclui o comportamento de boxear, empurrando e afastando o parceiro. Este comportamento inicia-se na fase pós-desmame em ratos e parece ser importante para o desenvolvimento social e cognitivo (Homberg et al, 2007). Rastejar sobre ou sob o parceiro e permanecer deitado com o corpo encostado também são componentes do comportamento social (Patin et al, 2005).

O estudo dos comportamentos de interação social parece ser importante para estabelecer se há nestes animais inadequações de comportamentos. Alterações nestes parâmetros podem ser indicativas de transtornos psiquiátricos. Postula-se que o desenvolvimento anormal do sistema nervoso durante o período de formação deste possa ter um papel no desenvolvimento de transtornos, como a esquizofrenia (Lee et al, 2007). Ao testarem-se interações sociais em ambientes novos, alguns comportamentos apresentados podem também ser indicativos de ansiedade (Patin et al, 2005).

Em humanos, as interações sociais são importantes para o desenvolvimento normal e esse tipo de interação parece ocorrer principalmente na adolescência, da mesma forma, em ratos este parece ser o período onde estas interações ocorrem em maior frequência. Além disso, as interações sociais nos ratos são sensíveis a fatores ambientais (Varlinskaya & Spear, 2008).

Dados experimentais sugerem que as diferentes formas de interações sociais podem ser mediadas por sistemas neurais distintos e que o status atual, de isolamento ou não e a familiaridade ou não do ambiente em que foi feito o teste podem interferir nos comportamentos sociais (Varlinskaya & Spear, 2008). Em fêmeas, assim como ocorre com a receptividade sexual, as fases do ciclo podem alterar a duração dos comportamentos sociais, ratas em proestro apresentaram mais tempo interagindo socialmente (Frye & Rhodes, 2008).

Alguns sistemas como o sistema serotoninérgico e ocitocinérgico estão envolvidos em interações sociais, podendo ser mediada pelos receptores para ocitocina e serotonina (5HT1A) (Thompson et al, 2007). Camundongos knockout para 5HT apresentam comportamento social reduzido (Homberg et al, 2007). Durante as interações sociais percebidas como positivas, a OT pode ser liberada (para revisão, Uvnas-Moberg, 1998).

## **JUSTIFICATIVA**

Os comportamentos sociais são fundamentais para a sobrevivência de mamíferos que vivem em sociedade. Após o nascimento, os mamíferos dependem da mãe e de um ambiente propício para que haja um desenvolvimento normal. O estresse sofrido na infância mostrou ser extremamente danoso para o SNC em humanos e animais experimentais, podendo afetar habilidades, entre elas, relacionadas a memória e sociabilidade. Considerando que durante o desenvolvimento do animal, os eventos que acontecem podem afetar sistemas neurais e comportamentos, durante a infância e futuramente, estudar as variações no ambiente do recém nascido e sua relação com comportamentos sociais na vida adulta parece ser importante visto que alguns tipos de estresse na infância podem ser determinantes de diversas patologias psicológicas ou não. As principais conseqüências nas variações do ambiente perinatal podem ser observadas na migração neuronal e nos níveis ou liberação de neuropeptídeos, induzindo a desequilíbrios nas relações sociais, como já está estabelecido em diversos estudos.

## **OBJETIVO GERAL**

Esta tese propõe-se a analisar o papel da manipulação neonatal no estabelecimento das relações sociais na vida adulta, como o reconhecimento de indivíduos bem como nas interações sociais entre os animais. Além disso, avaliar o possível efeito da manipulação neonatal na produção e na liberação de neuropeptídeos reconhecidamente envolvidos na modulação de comportamentos sociais.

### **Objetivo**

O objetivo deste estudo é determinar o impacto da manipulação neonatal sobre os comportamentos sociais em ratos adultos. Os objetivos específicos são:

Estudar (1) a memória social em ratos adultos manipulados e não-manipulados durante o período neonatal e (2) a interação social nestes animais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizadas ratas Wistar, prenhas, provenientes do biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As ratas foram colocadas em caixas forradas com maravalha e com água e comida *ad libitum*. Durante o período de gestação, a data do parto foi verificada diariamente e as caixas foram limpas de acordo com a rotina do biotério. No dia do nascimento dos filhotes, considerado dia 0, os animais não foram perturbados.

### Manipulação neonatal

No dia seguinte ao parto (dia 1), as prenhas com sua ninhada foram inseridas em um dos seguintes grupos e adotaram-se os procedimentos descritos a seguir:

Grupo não-manipulado: no dia 1, os filhotes excedentes a 8 foram retirados do ninho de modo que o experimentador não tocasse nos outros filhotes que permaneceriam com a mãe. A partir deste momento, as ninhadas do grupo não-manipulado não sofreram nenhum tipo de intervenção por parte do experimentador até completar 10 dias de idade.

Grupo manipulado: a partir do dia 1, os filhotes foram submetidos à manipulação por 1 minuto por dia, até completarem 10 dias de idade. A manipulação consistia em levar a caixa residência até a sala anexa do biotério, retirando-se a mãe da caixa e colocando-a em uma caixa ao lado e em seguida, segurar os filhotes todos juntos, retirando-os do ninho e manipulando-os suavemente pelo período de 1 minuto. Após este procedimento a mãe foi recolocada junto aos filhotes e a caixa devolvida ao biotério.

A partir do 11º dia, houve a restauração do processo de limpeza das caixas e no 21º dia, os filhotes foram desmamados e separados por sexo, em grupos de 3 a 4 animais. Os ratos machos foram utilizados para experimentos na idade adulta a partir do 90º dia de idade.

Todas as ratas adultas utilizadas foram submetidas à verificação diária do ciclo estral diariamente a partir do 70º dia e utilizadas após pelo menos 2 ciclos estrais regulares de 4 fases.

## **Experimento 1 –Memória social**

Avaliar o comportamento de memória social em ratos adultos submetidos à manipulação neonatal

### **Animais**

Os ratos machos foram divididos em 4 grupos: ratos adultos manipulados e não-manipulados sem experiência sexual, e ratos adultos, manipulados e não-manipulados com experiência sexual. As fêmeas, manipuladas e não-manipuladas, foram utilizadas após no mínimo 2 ciclos estrais consecutivos regulares, em diestro II.

### **Experiência sexual**

A experiência sexual foi obtida expondo dois machos a uma fêmea previamente ovariectomizada, tratada com estradiol mais progesterona a fim de tornar-se receptiva sexualmente (Estradiol e estradiol e progesterona 48 horas depois, de acordo com protocolo estabelecido em nosso laboratório). Os mesmos ratos foram utilizados, sem experiência sexual e com experiência sexual. Após o primeiro teste (grupos sem experiência sexual) os ratos foram então expostos às fêmeas receptivas por aproximadamente 24hs, para adquirirem experiência e então serem novamente testados (grupos com experiência sexual).

### **Teste**

Foi utilizado o protocolo habituação-desabituação, adaptado de Winslow & Camacho (1995) para testar a memória social em ratos adultos. Aos 90 dias de idade, aproximadamente, os ratos foram colocados em caixas de acrílico transparentes, isolados, com água e comida *ad libitum*, por no mínimo 7 dias. Após este período, o teste foi realizado. As fêmeas permaneceram na caixa de acrílico por pelo menos um ciclo completo, e foram testadas no diestro II. O teste foi feito durante o período de atividade dos animais, a partir das 18 hs, com as luzes apagadas e utilizando-se uma lâmpada vermelha. O procedimento ocorreu em uma sala isolada com temperatura controlada e após os animais, em suas caixas, serem levados a este local, houve um período de ambientação de no mínimo

20 minutos. Um rato juvenil macho, 21-30 dias de idade (Juvenil 1) é apresentado ao adulto por 4 sessões sucessivas de 2 minutos intercalados por 18 minutos de intervalo, o juvenil permanecendo em outra sala, durante o intervalo. Após as 4 sessões, um novo juvenil (Juv. 2) é apresentado ao adulto por 2 minutos. O teste consistiu em 5 sessões, 4 deles (S1, S2, S3 e S4) com o juvenil 1 e durante a última sessão (S5) foi apresentado o juvenil 2, para a desabituação.

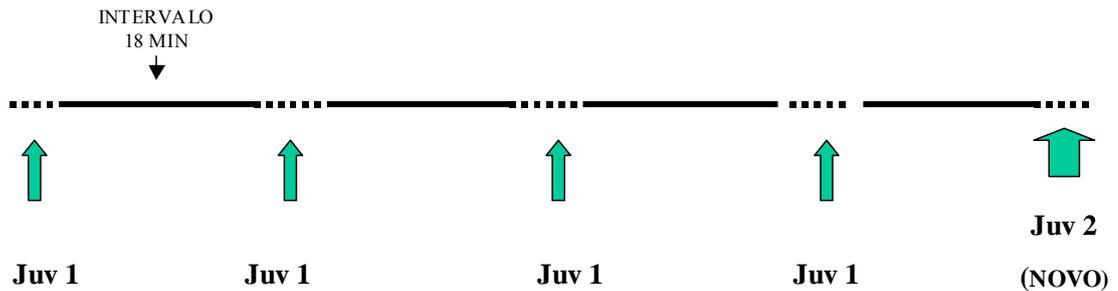


Figura 1. Representação esquemática do protocolo de memória social, utilizando-se o paradigma de habituação-desabituação. Habituação com o juvenil 1 e desabituação com o juvenil 2. Juv 1, juvenil 1; juv 2, juvenil novo.

## Parâmetros comportamentais avaliados

A frequência e a duração dos comportamentos foram analisados através de gravação em vídeo e os parâmetros comportamentais mensurados com o auxílio do programa The Observer (Noldus).

Cheirar o juvenil: comportamento de cheirar ativamente o corpo do juvenil, incluindo a região genital, cauda e cabeça, estando o rato residente com o focinho em direção, muito próximo do corpo do juvenil estímulo. Perseguir o juvenil, comportamento de seguir de perto o juvenil enquanto ele se movimenta.

## **Experimento 2- Interação social**

Avaliar se a manipulação durante o período neonatal altera o comportamento de interação social em ratos adultos.

### **Animais**

Os ratos machos foram divididos em 2 grupos: ratos adultos manipulados e não-manipulados. As fêmeas foram utilizadas após no mínimo 3 ciclos estrais consecutivos regulares, em diestro II.

### **Teste**

Ratos adultos foram submetidos ao teste de interação social, em uma arena específica, de acordo com Patin et al (2005). A arena de interação social consistiu em 3 caixas de acrílico (figura 2) (40x 45x 40cm) caixa A, B, com portas, e caixa neutra, estando ligadas por um corredor. Dois animais do mesmo grupo (não-manipulado x não-manipulado ou manipulado x manipulado) foram isolados 24 hs antes do teste em seu território (caixas A e B), no biotério.

O teste ocorreu durante o período escuro, com iluminação auxiliar. Na noite do teste, os animais foram levados para uma sala separada, aguardou-se o tempo de ambientação de 20 min e o início do teste foi estabelecido quando abria-se as portas das caixas A e B, permitindo-se aos animais explorarem toda a arena, incluindo a caixa neutra. Os animais foram filmados durante 15 minutos.

Figura 2. Arena do teste de interação social.

### **Parâmetros comportamentais avaliados**



A frequência e duração dos comportamentos foram analisadas através das gravações em vídeo e com o auxílio do programa The Observer (Noldus). Para cada par de ratos testado, os seguintes comportamentos sociais foram avaliados: latência da interação social (cheirar), duração e frequência do tempo de interação social entre os dois animais (cheirar, investigar), frequência e duração dos ataques e o tempo em que os animais estavam em caixas diferentes (territórios diferentes). Avaliou-se, para os machos 10 pares de ratos não-manipulados, 9 de ratos manipulados e para as fêmeas, 10 pares de não-manipuladas e 7 pares de manipuladas, sempre em diestro II.

### **Análise estatística**

Para o teste de memória social, foi obtida uma média ( $\pm$  EPM) da frequência e da duração do comportamento de cheirar os juvenis, que foi analisada por ANOVA de uma via, utilizando-se tempo como medida repetida. Posteriormente, cada grupo foi analisado separadamente por ANOVA de uma via. Para análise *pos-hoc* foi utilizado o teste Newman-Keuls. O nível de significância aceito foi  $p < 0,05$ .

Para a análise estatística do teste de interação social, a duração, frequência e latência de cada parâmetro comportamental foram expressas como média ( $\pm$  EPM) e analisadas pelo teste *t* de student. O nível de significância foi aceito caso  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Memória social

As figuras 3, 4 e 5 demonstram a duração, em segundos (s), do comportamento de cheirar os juvenis durante o teste de memória social.

O comportamento apresentado pelos ratos machos não-manipulados e manipulados, sem experiência sexual (figura 3) no paradigma habituação-desabituação foi estatisticamente diferente entre os grupos [ $F(1,24)=6,603$ ,  $p=0,01$ ], onde os ratos machos manipulados mostraram uma redução da duração de cheirar os juvenis. A ANOVA de uma via para medidas repetidas mostrou também efeito tempo [ $F(4, 96)=8,91$ ,  $p<0,001$ ].

Para os ratos com experiência sexual a ANOVA também mostrou efeito grupo [ $F(1, 23)=7,45$ ,  $p<0,01$ ] e tempo [ $F(4, 92)=14,84$ ,  $p<0,001$ ] (figura 4).

Cada grupo foi analisado separadamente por ANOVA. Os ratos machos sem experiência sexual não-manipulados não apresentaram habituação-desabituação. Os animais manipulados sem experiência sexual apresentam uma clara habituação-desabituação [ $F(4, 60)=2,991$ ,  $p<0,02$ ], indicada pela redução significativa do comportamento de cheirar durante as sessões 1 a 4, e um aumento na sessão 5 em comparação com a 4 (desabituação).

Nos ratos com experiência sexual a ANOVA detectou habituação e desabituação tanto no grupo não-manipulado [ $F(4, 55)=3,81$ ,  $p<0,01$ ] como no grupo manipulado [ $F(4, 60)=2,45$ ,  $p=0,05$ ].

A ANOVA de uma via, com medidas repetidas demonstrou que as fêmeas (figura 5) apresentaram um efeito significativo tempo [ $F(4, 84)=26,96$ ,  $p<0,001$ ] entretanto não houve efeito grupo [ $F(1, 21)=2,72$ ;  $p=0,11$ ], nem interação [ $F(4, 84)=1,41$ ]. A ANOVA, para cada grupo, separadamente, indicou que foi observada habituação e desabituação nas fêmeas não-manipuladas [ $F(4, 60)=7,18$ ,  $p<0,001$ ] e nas manipuladas [ $F(4, 45)=5,37$ ,  $p<0,01$ ].

## Interação social

### Latência da primeira interação social

Durante o teste de 15 minutos, a latência, em segundos (s), da primeira interação social (cheirar) não apresentou diferenças entre os grupos, tanto em machos [t (18)=0,65, p=0, 93] (figura 6A) quanto em fêmeas [t (15)=1,5, p=0, 15] (figura 6B)

### Duração e frequência do comportamento de cheirar

A figura 7A representa a duração do comportamento de cheirar em machos. O teste t mostrou que os pares de machos manipulados possuem uma menor duração do comportamento de cheirar do que os machos não-manipulados [t (18)=3,46, p=0,03], apesar de apresentarem uma tendência na frequência [t (20)=1,77, p=0, 091]. Entretanto nas fêmeas (figura 7B) a análise estatística não mostrou diferenças entre o grupo manipulado e não-manipulado, na duração [(t15)=0,10, p=0,92] e nem na frequência deste comportamento [(t 15)=1,5, p=0, 15].

### Frequência e duração dos ataques

O teste t demonstrou um aumento na frequência [(t13)=2,11 p=0,05], mas não detectou diferenças na duração [(t18)=0,41, p=0,68] dos ataques entre os pares de machos manipulados e não-manipulados (Fig. 8A) testados durante o teste. Nas fêmeas (Fig. 8B), a frequência [(t14)=0,31, p=0,75] e a duração deste comportamento também não apresentaram diferenças entre os grupos.

### Territórios diferentes

Os pares de ratas manipuladas apresentaram uma diminuição do tempo despendido em território diferente [(t13)=2,209, p=0,004], indicando que as fêmeas manipuladas permanecem menor tempo em comportamento não social (fig. 9 A). Os pares de machos não apresentaram diferenças neste parâmetro (fig. 9 B).

## Memória Social

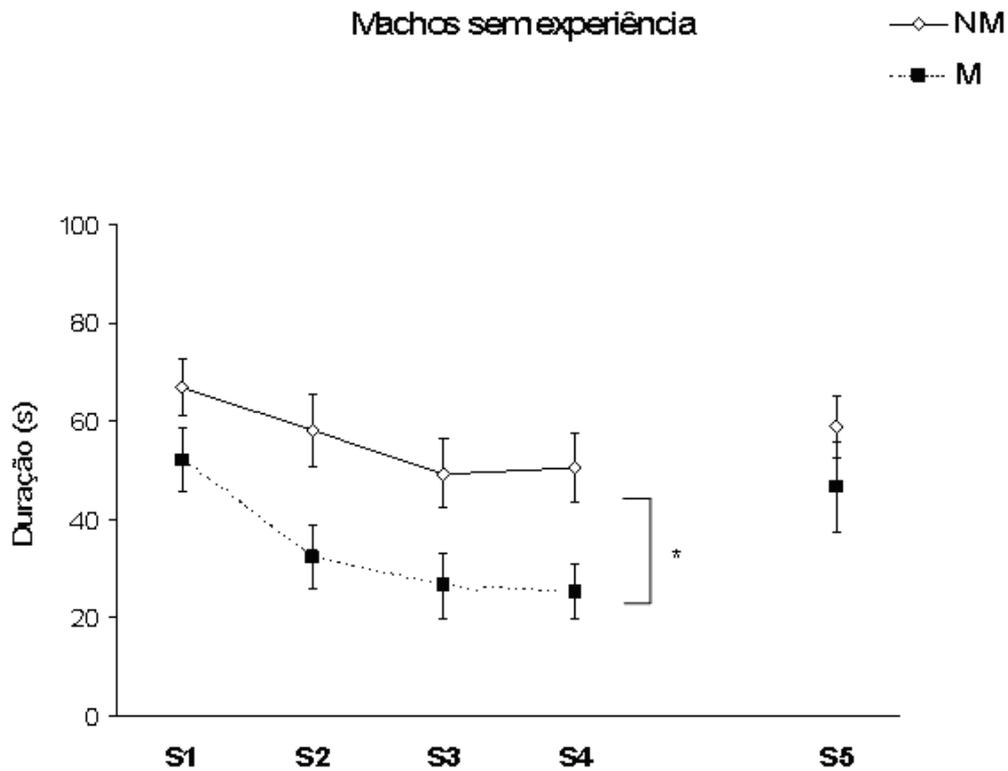


Figura 3. Memória social. Duração do comportamento de cheirar, em segundos (s), em ratos não-manipulados (NM) e manipulados (M) no período neonatal, adultos, sem experiência sexual, sendo o mesmo juvenil apresentado por quatro sessões de 2 min intercaladas por 18 minutos (S1-S4); seguido por uma sessão com um juvenil diferente (S5). Os dados são expressos como média ( $\pm$ EPM) da duração do comportamento de cheirar os juvenis e analisados por ANOVA de uma via, utilizando-se sessão como medidas repetidas. \* $p < 0,05$  comparando-se ao grupo não-manipulado.  $n=12-13$  para cada grupo.

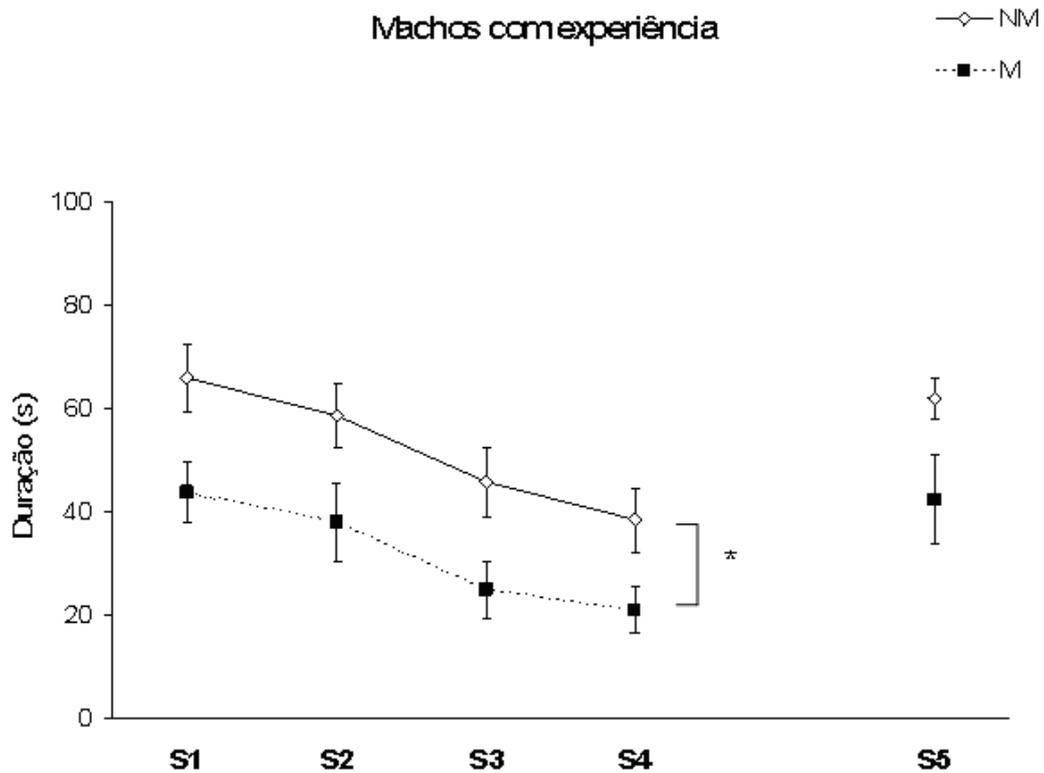


Figura 4. Memória social. Duração do comportamento de cheirar, em segundos (s) em ratos não-manipulados (NM) e manipulados (M) no período neonatal, adultos, com experiência sexual, sendo o mesmo juvenil apresentado por quatro sessões de 2 min intercaladas por 18 minutos (S1-S4); seguido por uma sessão com um juvenil diferente (S5). Os dados são expressos como média ( $\pm$ EPM) da duração do comportamento de cheirar os juvenis e analisados por ANOVA de uma via, utilizando-se sessão como medidas repetidas. \* $p < 0,05$  comparando-se ao grupo não-manipulado.  $n = 12-13$  para cada grupo.

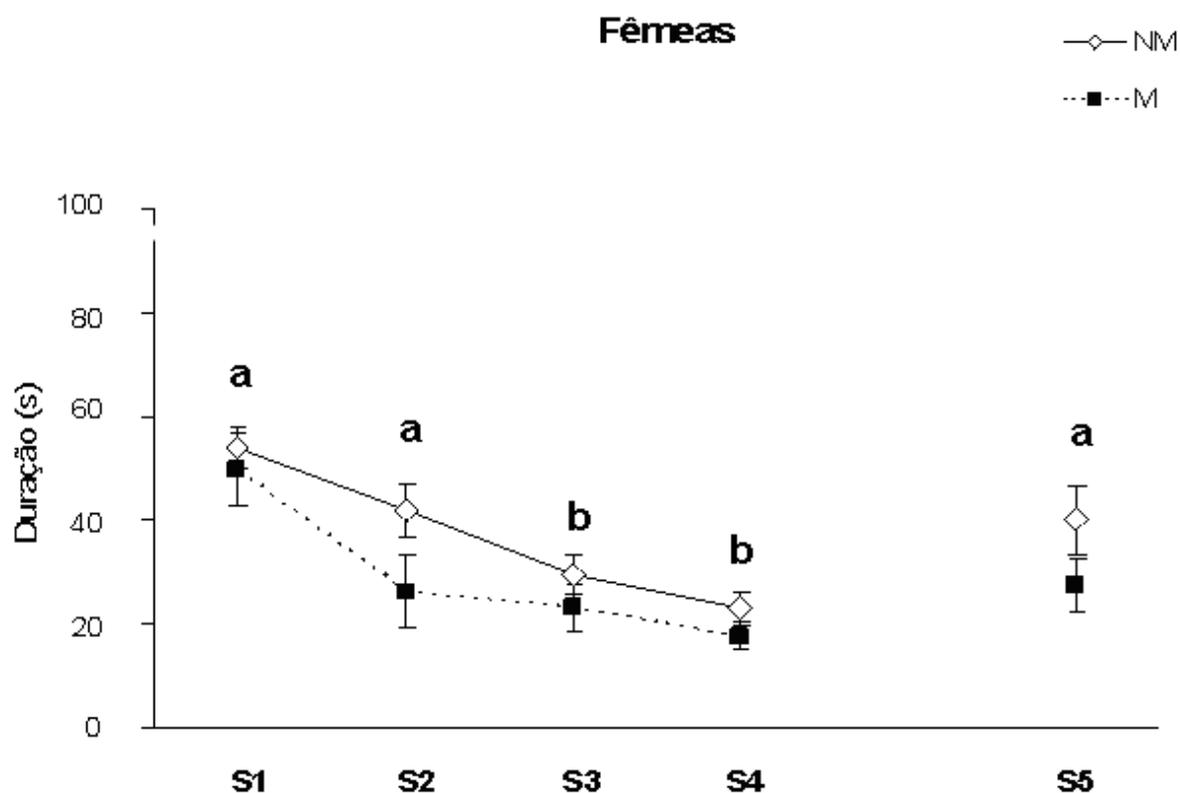


Figura 5. Memória social. Duração do comportamento de cheirar, em segundos (s), em ratas não-manipuladas (NM) e manipuladas (M) no período neonatal, adultas, em diestro, sendo o mesmo juvenil apresentado por quatro sessões de 2 min intercaladas por 18 minutos (S1-S4); seguido por uma sessão com um juvenil diferente (S5). Os dados são expressos como média ( $\pm$ EPM) da duração do comportamento de cheirar os juvenis e analisados por ANOVA de uma via, utilizando-se sessão como medidas repetidas. a-b,  $p < 0,05$  comparando-se as sessões.  $n=12-13$  para cada grupo.

## Interação social

### Cheirar

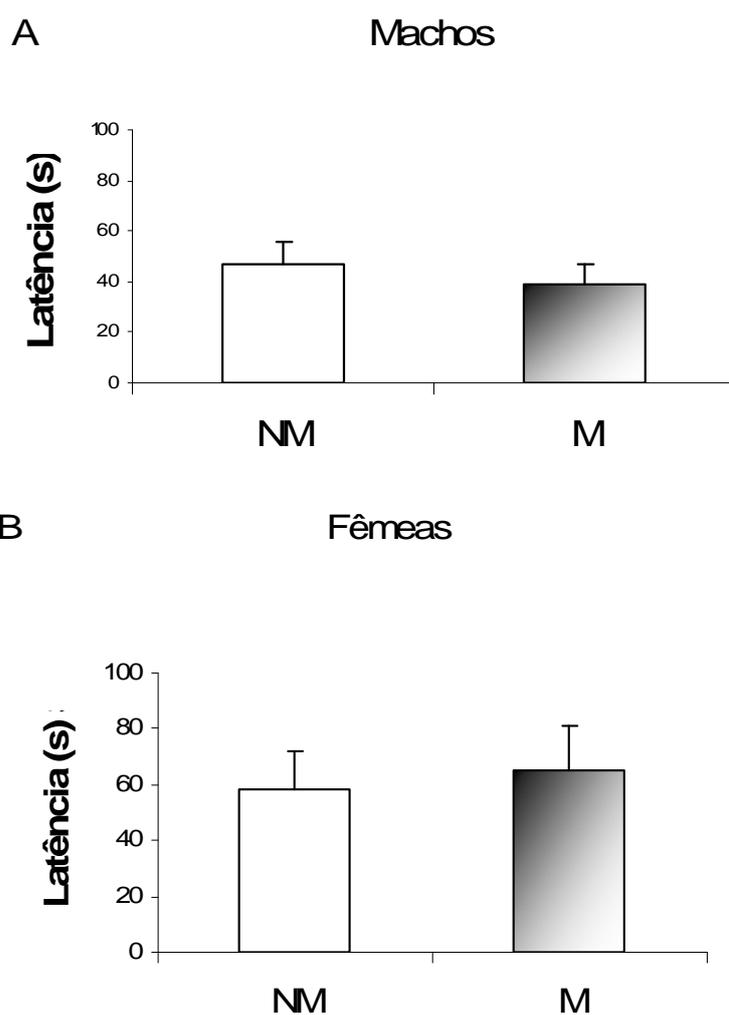


Figura 6. Interação social. Latência, em segundos(s), do comportamento de cheirar em ratos adultos machos (A) e fêmeas (B) não-manipulados (NM) e manipulados (M) no período neonatal, adultas, no teste de interação social. Os dados são expressos como média ( $\pm$ EPM) da latência do comportamento de cheirar e analisados pelo teste t de Student. \* $p < 0,05$  comparando-se ao grupo não-manipulado.  $n = 7-11$  em cada grupo.

## Cheirar

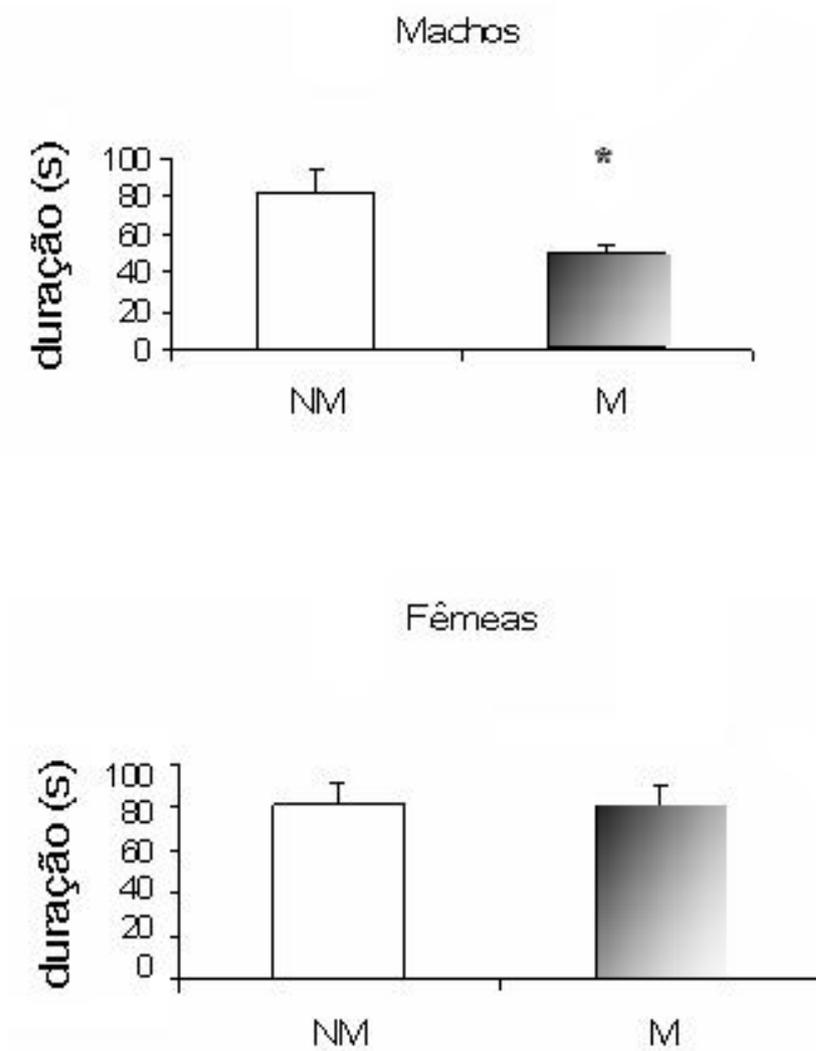


Figura 7. Interação social. Duração do comportamento de cheirar, em segundos (s), em ratos adultos machos (A) e fêmeas (B), não-manipulados (NM) e manipulados (M) no período neonatal, no teste de interação social. Os dados são expressos como média ( $\pm$ EPM) da duração do comportamento de cheirar e analisados pelo teste t de Student. \* $p < 0,05$  comparando-se ao grupo não-manipulado.  $n = 7-11$  em cada grupo.

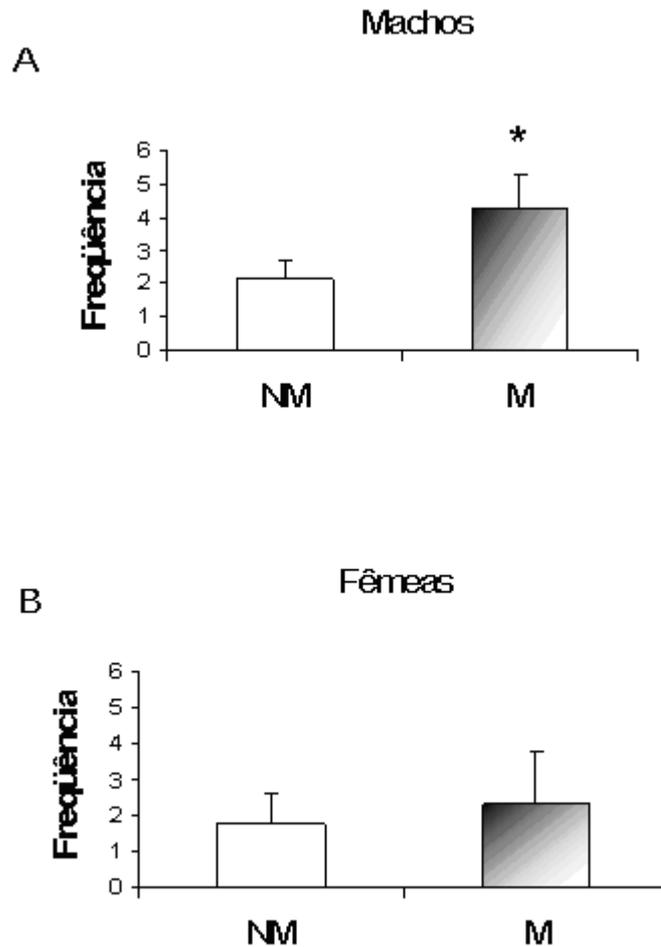
**Atacar**

Figura 8. Interação social. Frequência do comportamento de atacar em ratos adultos, machos (A), e fêmeas (B), não-manipulados (NM) e manipulados (M) no período neonatal, no teste de interação social. Os dados são expressos como média ( $\pm$ EPM) da duração do comportamento de lutar e analisados por teste t de Student. \* $p=0,05$  comparando-se ao grupo não-manipulado.  $n=7-11$  em cada grupo.

## Territórios diferentes

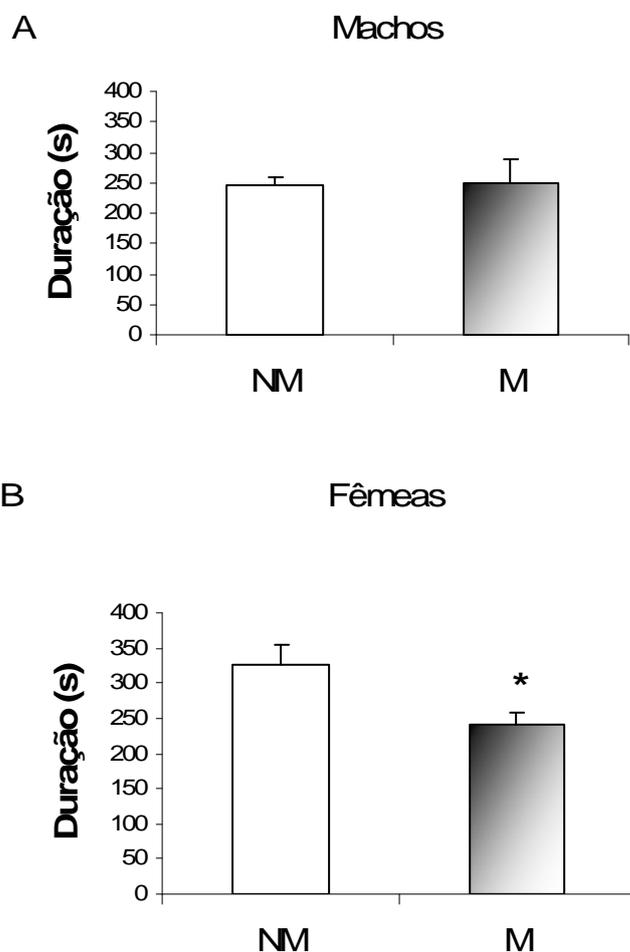


Figura 9. Interação social. Duração, em segundos (s), em que os ratos permanecem em territórios diferentes. A) machos; B) fêmeas, não manipulados (NM) e manipulados (M) no período neonatal. Os dados são expressos como média ( $\pm$ EPM) da frequência do comportamento de lutar e analisados pelo teste t de Student. \* $p < 0,05$  comparando-se ao grupo não-manipulado.

## DISCUSSÃO

Os comportamentos sociais na vida adulta são muito afetados por alterações que ocorrem durante a formação do sistema nervoso central, como por exemplo, durante o período pré-natal ou pós-natal. Há vários tipos de estresse que podem ser aplicados nos filhotes e observadas as conseqüências na vida adulta, estresses por separação longa, por manipulações breves, por alteração das condições do ninho. Estas interferências apresentam um impacto em comportamentos e alterações em sistemas neurais na vida adulta (Brunson et al, 2005, Fenoglio et al, 2006, Papaioannou et al, 2002b, Kosten et al, 2007).

Eventos que estressam a rata parturiente (estresse pré-natal) levaram a mudanças nas interações sociais dos animais na vida adulta, os machos apresentaram redução no comportamento de cheirar e um aumento na agressividade (Patin et al, 2005). Outro estudo também avaliou comportamentos sociais de machos cujas mães foram estressadas durante a gravidez, e apontou comportamentos sociais diminuídos (Lee et al, 2007). Nossos resultados mostraram que a manipulação neonatal também induz a alterações nos comportamentos sociais. A manipulação neonatal durante os dez primeiros dias de vida reduziu o tempo de investigação social, representados pelo comportamento de cheirar, em ratos machos nos testes de memória social e no teste de interação social.

Vários estudos têm sido feitos analisando os comportamentos em ratos que foram submetidos a alterações no ambiente durante o período neonatal. Está bem estabelecido que ratos manipulados apresentam menor ansiedade em ambientes novos, como o teste em labirinto e campo-aberto, além de apresentarem um prejuízo no comportamento sexual (Meerlo et al, 1999, Padoin et al, 2001).

Neste trabalho, o objetivo foi avaliar o efeito da manipulação, entretanto nossos resultados foram distintos entre os sexos, pois nos testes obtidos os machos manipulados apresentaram reduções na interação social e aumento no comportamento agressivo, enquanto nas fêmeas manipuladas não se observaram diferenças. Avaliação de ratos adultos em testes de memória em outros estudos também apontaram diferenças entre os sexos, enquanto os machos tiveram uma melhor performance no reconhecimento de objetos, as fêmeas obtiveram melhores resultados em testes de esquiva inibitória (Kosten et al, 2005, Kosten et al, 2007). Estas diferenças entre os sexos provavelmente dependem das ações dos esteróides gonadais

sobre o hipocampo, evidenciando os efeitos dependentes do sexo causados pelas intervenções no período neonatal em eventos relacionados à memória (Kosten et al, 2005).

O desempenho no teste de memória social não apresentou diferenças entre os grupos, pois os ratos manipulados apresentaram a habituação e desabituação esperadas. Apesar da diminuição do tempo total de investigação, os ratos manipulados não apresentaram prejuízo no teste de memória social. Tang et al (2003) avaliou a memória social em ratos adultos submetidos a um tipo semelhante de estimulação neonatal (por ambientes novos), observando que houve melhora dos animais submetidos à estimulação neste teste. De fato, eventos que alteram o ambiente no período neonatal parecem realmente causar efeitos na memória na vida adulta. Camundongos manipulados no período neonatal, procedimento que induziu ao aumento do comportamento parental apresentaram uma melhora na memória espacial, na vida adulta (Bredy et al, 2004). Foi mostrada uma melhora no teste de reconhecimento de objetos em animais manipulados, tanto em fêmeas quanto em machos. Entretanto, testes de memória envolvendo aversividade, como a esQUIVA inibitória, mostraram uma piora nos animais manipulados. (Kosten et al, 2007). Muitos modelos têm sido utilizados para testar eventos que afetam aspectos neurais no período neonatal. Muitos estudam o papel da influência materna na ativação de mediadores moleculares de estresse no rato imaturo, e a resposta da mãe na volta dos filhotes à caixa. Por exemplo, breves períodos diários de separação (15 minutos) são considerados estresse leve, em contraste, períodos maiores de separação (3 a 24 horas) são considerados modelos de estresse mais severos. Ambos os tipos de estresse, no começo da vida, induzem conseqüências a longo prazo. A função de memória mediada pelo hipocampo é facilitada em roedores adultos e primatas não-humanos que tiveram aumento do comportamento maternal ou enriquecimento ambiental. Entretanto o estresse severo induz ao prejuízo na função hipocampal e na memória na vida adulta (Fenoglio et al, 2006). A melhora cognitiva ou mesmo a ausência de prejuízos a cognição em ratos manipulados pode ser devido a maior sobrevivência de neurônios no hipocampo, pois filhotes que foram cuidados por mães com alta freqüência de comportamento maternal induziram ao aumento da sobrevivência neuronal no hipocampo em adultos (Bredy et al, 2003).

O teste de interação social avaliou pares de ratos submetidos à manipulação e comparou com pares não-manipulados. A duração do comportamento de cheirar apresentou uma redução entre ratos machos manipulados. Entretanto não foi observado diminuição da interação social entre ratas fêmeas manipuladas. Resultados de nosso laboratório mostraram que os comportamentos das fêmeas manipuladas são suscetíveis a mudanças no ambiente neonatal, pois outros tipos de comportamentos sociais, como o comportamento sexual em

fêmeas manipuladas apresentaram alterações importantes, como a diminuição da frequência de lordoses, e nos machos como a menor quantidade de montas, conforme Padoin et al, (2001). Neste sentido, os comportamentos sociais não sexuais, como a interação entre dois machos adultos, também podem envolver componentes de ansiedade, pois investigar um indivíduo desconhecido pode induzir a ativação do eixo HPA (Patin et al, 2005). Alguns estudos sugerem que a diminuição do tempo de investigação pode ser devido a um aumento na ansiedade (Lee et al, 2007). Visto que os ratos que sofreram manipulação têm como principal característica uma redução da ansiedade, este resultado não deve ser interpretado deste modo, principalmente por que não houve diferenças na latência da investigação social. A diminuição do tempo em que os machos permanecem cheirando pode ser interpretada, neste teste, como uma inabilidade em estabelecer ligações sociais.

Os efeitos de ambientes novos sobre a interação social parecem ser dependentes de gênero e idade, pois machos adultos são mais sensíveis aos ambientes novos do que fêmeas e ratos adolescentes. Ambos os testes de memória e de interação social foram feitos em ambientes familiares, isto é, os animais permaneciam pelo menos 7 dias na caixa, quando testados na habituação e desabituação assim como os animais testados na interação social permaneciam cerca de 24 horas na caixa antes do teste. Estes pesquisadores ainda sugerem que a familiaridade do local onde foi feito o teste também pode interferir no resultado. O isolamento social prévio ao teste mostrou ser capaz de induzir ao aumento de todas as formas de atividades sociais (Varliskaya & Spear, 2008).

Os sintomas negativos, como a menor sociabilidade, podem ser devido a menor quantidade de neuropeptídeos relacionados a ligações sociais, como a OT e VP em regiões do sistema nervoso central que são importantes em promover comportamentos afiliativos, tais como a amígdala central (Lee et al, 2007) entretanto estes parâmetros devem ser estudados mais detalhadamente.

## Conclusões

Este capítulo observou os efeitos da manipulação neonatal sobre comportamentos sociais em ratos adultos. Primeiro testou-se a memória social, onde se pôde constatar que de modo geral a manipulação não prejudicou o reconhecimento social nos animais manipulados, pois observa-se a habituação e desabituação tanto em machos como em fêmeas. Entretanto, detectou-se uma redução significativa do tempo em que os machos adultos permaneceram cheirando os juvenis durante as sessões. Nas fêmeas testadas observou-se uma redução mais sutil do comportamento investigatório ao juvenil também. Esse resultado nos induziu a fazer uma investigação em outros parâmetros comportamentais, avaliando a interação social em ratos manipulados na infância.

O teste de interação social, onde testamos pares de ratos adultos e o modo como interagem entre si confirmou nos machos a tendência a passar menos tempo cheirando/investigando o parceiro durante o teste. Não foi possível observar o mesmo resultado nas fêmeas neste mesmo parâmetro. O teste de interação social também avaliou os comportamentos agressivos entre os pares de ratos não-manipulados e manipulados, demonstrando um aumento na agressividade, embora não tenha sido possível detectar diferenças significativas entre as fêmeas. De maneira geral estes testes de comportamentos desenvolvidos neste estudo avaliaram outros tipos de comportamentos sociais que já foram estudados em ratos submetidos a interferências no período neonatal, como o comportamento sexual ou de preferências. Estes dados nos mostram que a manipulação altera comportamentos sociais em geral nestes animais.

## CAPÍTULO 2

### EFEITOS DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A LIBERAÇÃO PERIFÉRICA E SOBRE A PRODUÇÃO CENTRAL DA OCITOCINA

## INTRODUÇÃO

### Ocitocina

A ocitocina (OT) faz parte do sistema hipotálamo-neuro-hipófise. Este sistema é formado por dois importantes núcleos hipotalâmicos que produzem ocitocina e vasopressina e liberam seus produtos diretamente na neuro-hipófise, o núcleo paraventricular (PVN) e o núcleo supraóptico (SON). O núcleo supraóptico é formado na maior parte por células magnocelulares, com diâmetro de 20 a 35  $\mu\text{m}$ , situa-se nas bordas laterais do quiasma óptico e projeta maciçamente para a neuro-hipófise (para revisão, Swanson & Sawchenko, 1983, Paxinos, 1985, Kiss & Mikkelsen, 2005).

O núcleo paraventricular sintetiza mais de 20 neurotransmissores ou peptídeos e possui três zonas funcionais: a zona parvocelular, a zona médiocelular e a zona magnocelular (Kiss et al, 1991). Os neurônios magnocelulares do PVN e do SON sintetizam, transportam e liberam na neuro-hipófise OT e vasopressina (VP) e suas respectivas proteínas carreadoras, as neurofisinas, formando o sistema *hipotálamo-neurohipofiseal* (HNN). Várias regiões enviam aferências para a porção magnocelular do PVN, entre elas a amígdala, o bulbo olfatório, o septo, outros núcleos hipotalâmicos, órgão subfornicial, entre outros (Cunningham & Sawchenko, 1991).

O sistema neuro-hipofisário é dependente da atividade elétrica dos neurônios magnocelulares, que são ativados ou inibidos principalmente por glutamato e GABA (Oliet & Piet, 2004).

Os neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos possuem uma plasticidade, que pode ser alterada dependendo da demanda fisiológica que necessita um aumento da atividade destas células, como por exemplo, desidratação, lactação e durante o parto. Os neurônios magnocelulares hipertrofiam e há um aumento das sinapses glutamatérgicas e GABAérgicas, bem como uma diminuição da quantidade de astrócitos na região e diminuição dos seus prolongamentos (Oliet & Piet, 2004). Os neurônios do SON apresentam alterações morfológicas de acordo com a atividade desempenhada. Durante a lactação o corpo celular e os dendritos aumentam e há um aumento nos contatos sinápticos nos neurônios ocitocinérgicos, modificando a arborização dendrítica em comparação com ratas virgens. (para revisão, Cunningham et al, 2004).

No PVN, as divisões parvocelulares sintetizam CRH e também OT e VP, que podem projetar para outras áreas do SNC, constituindo uma via separada de secreção, modulando alguns comportamentos. Apenas 0,2 % dos neurônios ocitocinérgicos projetam concomitantemente para a neuro-hipófise e para outras áreas do SNC (para revisão, Gimpl & Farenholz, 2001).

A OT é sintetizada nos neurônios do PVN e SON, a partir de uma grande molécula precursora. Nos humanos o gene para OT consiste em três exons, que codificam o sinal translocador, a ocitocina e a neurofisiina associada. Esta molécula, chamada OT prepropeptídeo, sofrem clivagens enquanto está sendo transportado ao longo do axônio cujos terminais localizam-se na neuro-hipófise. O produto final liberado no terminal axônico é a OT e sua molécula carreadora, a neurofisiina. Existem neurofisininas associadas tanto à OT como à VP que formam uma ligação com o peptídeo dentro da vesícula secretora, sendo liberadas junto com estes. A neurofisiina também tem função de empacotar e armazenar a OT no terminal antes de ser liberada (Ben-Barak et al, 1985; Gimpl & Farenholz, 2001). Este nanopeptídeo ou análogo a ele, é encontrado em praticamente todos os grupos de vertebrados (Para revisão, Debiec, 2007).

Os sinais sensoriais são levados das vísceras através de aferentes craniais e espinhais. Os neurônios chegam principalmente dos núcleos do tronco encefálico: núcleo do tracto solitário, medula ventrolateral e núcleo parabraquial pontino. Os neurônios destas regiões projetam diretamente para os núcleos hipotalâmicos PVN e SON. O núcleo parabraquial projeta poucas fibras para o PVN ou SON, entretanto há várias projeções que enviam para o núcleo da base da estria terminal e núcleo central da amígdala que por sua vez inervam o PVN. Destes neurônios a grande maioria são neurônios que expressam adrenalina e noradrenalina, e já estão presentes desde o período neonatal (Rinaman, 2007).

Nas fêmeas lactantes, a liberação periférica deste peptídeo estimula a ejeção do leite contraindo as células mioepiteliais que envolvem os alvéolos e ductos nas glândulas mamárias. Também age no músculo liso do endométrio, estimulando contrações rítmicas no útero responsáveis pela expulsão do feto (Samson, 1996). Em machos de várias espécies a liberação sistêmica de OT pode estar envolvida na ejaculação, agindo no músculo liso do sistema reprodutivo e regulando a espermatogênese em ratos (Cunningham & Sawchenko, 1991, Gimpl & Farenholz, 2001).

Normalmente a OT é detectada em baixos níveis no plasma, mas em níveis maiores durante o parto e lactação e também em machos e fêmeas durante alguns tipos de estresse. Dor intensa, alta temperatura e som alto podem inibir a secreção de OT, enquanto hemorragia e

estresse (por contenção, ambientes novos e medo) estimulam a sua secreção (Samson, 1996). Ratos expostos ao nado forçado e à imobilização apresentaram um aumento na secreção plasmática de OT, estes tipos de estresse parecem ser estímulos fortes para a liberação deste peptídeo (Lang et al, 1983).

Há uma relação entre a OT central e as respostas cardíacas ao estresse pois existem conexões entre o PVN e o complexo vagal dorsal (Morris et al, 1995).

O receptor para OT é uma proteína com 7  $\alpha$ -hélices transmembrana e 389 aminoácidos, acoplado a proteína G. Até o momento descrito somente um tipo, que está presente nos tecidos periféricos e no SNC (Gimpl & Fahrenholz, 2001). Perifericamente ocorrem receptores para OT em células ósseas, mioblastos, células cardíacas e endoteliais (para revisão, Zingg & Laporte, 2003).

Sítios de ligação para OT possuem ampla distribuição no cérebro: no sistema olfatório, nos núcleos basais, no sistema límbico, no tálamo, no hipotálamo, algumas regiões corticais, no tronco cerebral e na medula espinhal. A maior concentração de receptores é encontrada no núcleo olfatório anterior, hipotálamo ventromedial, amígdala central e no subículo ventral. A localização destes sítios de ligação muda de acordo com o desenvolvimento do animal, pois aos 10 dias de vida, os ratos apresentam maior densidade de receptores para OT no córtex cingulado e retrosplenial, na substância gelatinosa do núcleo do trigêmeo, caudado-putamen, subículo dorsal, entretanto aos 90 dias, há diminuição ou desaparecimento dos receptores nestes locais (Tribollet et al, 1992). Também foi descrito receptores para OT no bulbo olfatório, no tubérculo olfatório e em outros núcleos da amígdala, que podem estar relacionados à percepção ou modulação de estímulos olfativos (Caldwell, 1992). Foram descritos receptores no córtex insular e perirrinal, subículo ventral, caudado-putamen dorsolateral, núcleo acumbens, septo lateral, núcleo da base da estria terminal, núcleo medial tuberal, complexo mamilar, oliva dorsal, núcleo espinhal trigeminal, núcleo do trato solitário e área tegmental ventral (DeWied et al, 1993, Morris et al, 1995, Pedersen et al, 1995).

Além da liberação axonal, sabe-se que a OT pode ser liberada centralmente pelos dendritos e pelo corpo celular, no hipotálamo, sendo que esta liberação é independente da secreção para o sangue (para revisão, Ludwig & Leng, 2006). Centralmente, a OT tem sido descrita por exercer papéis na modulação de vários comportamentos, entre eles, maternal, sexual e alimentar e responder a vários peptídeos hipotalâmicos, por exemplo, orexina, leptina, hormônio estimulador do alfa-melanócito ( $\alpha$ MSH) (para revisão, Sabatier, 2006). A OT possui papel em vários tipos de interações sociais como comportamento sexual, maternal, agressivo maternal (Engelmann et al, 2000).

A destruição dos núcleos produtores de OT atrasa a resposta maternal em ratas, e a microinjeção central de OT aumenta o comportamento maternal em camundongas virgens e lactantes em relação aos filhotes. Alguns trabalhos relatam que camundongas knockout para o gene da OT apresentam comportamento maternal intacto, entretanto outros estudos apontam para prejuízos neste comportamento em camundongas com este genótipo (para revisão, Lim & Young, 2006).

Parte da OT hipotalâmica é produzida nos neurônios parvocelulares do PVN que projetam para regiões do sistema límbico, tais como hipocampo, estriado, amígdala, hipotálamo, núcleo acumbens, locus coeruleus e núcleo do tracto solitário, agindo como um importante neurotransmissor ( Lim & Young, 2006, Ludwig & Leng, 2006). Fibras contendo e terminais nervosos contendo OT são encontrados em diversas regiões, principalmente no tronco cerebral e na medula espinhal. A OT pode ser liberada somatodendriticamente em várias situações fisiológicas e difundir para outras regiões do SNC. Presume-se que a OT originada dos neurônios parvocelulares teriam função de mediar vários comportamentos. Várias regiões onde há alta densidade de receptores para OT, por exemplo, a amígdala e o bulbo olfatório apresentam poucas fibras em direção a estas áreas. Então, postula-se que em regiões que há alta densidade de receptores e pouca inervação originada de neurônios parvocelulares a OT possa ser originada da liberação somatodendrítica de neurônios magnocelulares (Sabatier, 2006).

Wallner et al (2006) reportou a liberação plasmática de OT durante encontros sociais, sexuais ou não, em ratos machos e fêmeas. Altas concentrações de OT foram encontradas no líquido-cérebro-espinhal de machos após a ejaculação (Sabatier, 2006). A injeção central de OT em fêmeas tratadas com progesterona aumentou o quociente de lordoses quando expostas a machos sexualmente ativos enquanto a injeção de OTA inibiu o comportamento sexual destas (Pedersen & Boccia, 2002). Existe uma alta densidade de receptores para OT em regiões hipotalâmicas relacionadas ao comportamento sexual, como o hipotálamo ventromedial e a área preóptica medial (Greer et al, 1986, Caligioni et al, 2007).

A OT também pode ser liberada durante a escolha e a formação de pares e seus receptores centrais, em áreas subcorticais importantes, são ativados durante alguns tipos específicos de sentimentos, como o amor maternal (para revisão, Zeki et al, 2007). Este peptídeo pode agir regulando comportamentos relacionados a estresse e no aprendizado e memória, bem como na emocionalidade, em associação com a VP (Engelmann et al, 2000). A OT facilita a motivação social e o comportamento de aproximação, e parece ser fundamental

em processos de memória social, onde é importante a discriminação de indivíduos familiares ou não (Lim & Young, 2006).

A sobrevivência das espécies animais depende do seu sucesso reprodutivo. A reprodução necessita de vários circuitos integrados que induzirá o animal pronto para o acasalamento encontrar o seu par culminando com a fertilização. Na maioria dos animais, o instinto sexual está sincronizado com o pico da fertilidade. Vários trabalhos têm estudado o papel dos neuropeptídeos na resposta sexual, e foi descrito que a OT e a VP são liberados durante o desejo sexual em humanos, e que estes peptídeos afetam a amígdala durante estes processos (para revisão, Debiec, 2007). Vários estudos também indicam o papel da OT no comportamento monogâmico de espécies de roedores, como os ratos das pradarias. Estes roedores apresentam um comportamento de exclusividade a somente um parceiro facilitado pela infusão de OT via intracerebroventricular (Carter et al, 1992). Em humanos, presume-se que a OT esteja relacionada ao amor romântico, associado ao comprometimento e a confiança (Debiec, 2007).

Após o parto, o comportamento maternal é de crucial importância para a sobrevivência dos mamíferos. O estado hormonal durante a gravidez estimula a síntese e liberação de OT, ocorrendo maior expressão de seus receptores, principalmente nas regiões como área tegmental ventral, área preóptica medial, amígdala, núcleo da base da estria terminal e bulbo olfatório (Debiec, 2007).

Também parece estar relacionada com o circuito ansiolítico central (para revisão, Carrasco & van der Kar, 2003). Os estados de estresse desencadeiam respostas adaptativas que visam manter a homeostasia do organismo. Alguns estados, como a gravidez e lactação possuem respostas ao estresse atenuadas. Alguns estudos têm demonstrado a inibição do eixo HPA pela OT, sendo que há um aumento da liberação de ACTH e corticosterona após a injeção central de antagonista para OT (OTA) em ratos machos e fêmeas (Neumann et al, 2000).

Alguns estudos sugeriram que autistas possuem anormalidades na função ocitocinérgica. Em humanos, menor expressão de ocitocina bem como de seus receptores pode estar relacionado a esta patologia, principalmente no gênero masculino (Carter, 2006). Medidas na concentração plasmática de OT foram feitas em pacientes autistas e indivíduos normais e detectaram-se níveis plasmáticos menores nos autistas (Modahl et al, 1998).

## **JUSTIFICATIVA**

Os comportamentos sociais são fundamentais para a manutenção da espécie. Estes comportamentos são modulados por várias estruturas no SNC, onde agem determinados neurotransmissores. Além de desempenhar funções importantes na reprodução de fêmeas de mamíferos, a OT tem sido descrita por desempenhar um papel importante, agindo no sistema nervoso central, em vários comportamentos, incluindo social, sexual, maternal e emocionais (Amico et al, 2004, Carter, 2005). Possuindo efeitos antidepressivos, ansiolíticos e sedativos e alterando a resposta ao estresse em roedores (Miranda-Cardenas et al, 2006; Neumann, 2002). Além disso, a OT parece ser sensível a alterações ambientais causadas nos primeiros dias de vida e estar relacionada a prejuízos em comportamentos sociais (Carter, 2005).

## **Objetivo**

Este trabalho tem o objetivo de investigar os efeitos induzidos pela manipulação neonatal ao sistema ocitocinérgico, em filhotes e adultos. Os objetivos são:

Estudar (1) a liberação plasmática de OT em filhotes manipulados e não-manipulados durante o período neonatal; (2) a resposta plasmática da OT ao estresse em ratos adultos (3) a distribuição dos neurônios ocitocinérgicos magnocelulares no PVN e SON e parvocelulares no PVN em ratos adultos e (4) a quantidade de OT no PVN em ratos adultos, machos e fêmeas em diestro.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais**

Foram utilizadas ratas Wistar, prenhas, provenientes do biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As ratas foram colocadas em caixas, utilizando-se maravalha como substrato e água e comida ad lib. Durante o período de gestação, verificou-se diariamente a data do parto e as caixas foram limpas de acordo com a rotina do biotério. No dia do nascimento dos filhotes, considerado dia 0, os animais não foram perturbados.

### **Manipulação neonatal**

No dia seguinte ao parto (dia 1), as prenhas com sua ninhada foram inseridas em um dos seguintes grupos e adotaram-se os procedimentos descritos a seguir: grupo não-manipulado: no dia 1, os filhotes excedentes a 8 foram retirados do ninho de modo que o experimentador não tocasse nos outros filhotes que permaneceriam com a mãe. A partir deste momento, as ninhadas do grupo não-manipulado não sofreram nenhum tipo de intervenção por parte do experimentador até completar 10 dias de idade.

Grupo manipulado: a partir do dia 1, os filhotes foram submetidos à manipulação por 1 minuto por dia, até completarem 10 dias de idade. A manipulação consistiu em levar a caixa residência até a sala anexa do biotério, retirando-se a mãe da caixa e colocando-a em uma caixa ao lado e em seguida, segurar os filhotes todos juntos, retirando-os do ninho e manipulando-os suavemente pelo período de 1 minuto. Após este procedimento a mãe foi recolocada em sua caixa e a caixa devolvida ao biotério.

A partir do 11º dia, houve a restauração do processo de limpeza e no 21º dia, os filhotes foram desmamados e separados por caixa, em grupos de 3 a 4 animais. Os animais foram utilizados para experimentos na idade adulta a partir do 90º dia de idade.

As ratas foram submetidas à verificação diária do ciclo estral diariamente a partir do 70º dia e utilizadas após pelo menos 2 ciclos estrais regulares de 4 fases.

## Verificação do Ciclo estral

A partir do 70º dia de idade, ocorreu a verificação diária do ciclo estral das fêmeas através de esfregaços vaginais com solução salina 0,9%. Os esfregaços foram analisados em microscópio óptico e anotados em planilha. Após pelo menos 2 ciclos estrais regulares com 4 fases as ratas foram consideradas aptas para o experimento. Todas as ratas adultas foram utilizadas na fase diestro II.

## **Experimento 1-Avaliação da concentração plasmática da OT em filhotes de 10 dias manipulados durante o período neonatal**

Ratos filhotes, machos e fêmeas no décimo dia de vida foram decapitados, para posterior coleta do sangue do tronco nas seguintes condições:

Grupo não-manipulado (controle) NM: os animais foram retirados do ninho e imediatamente decapitados.

Grupo manipulação única (MU): ratos do grupo não-manipulado, no décimo dia de vida foram submetidos à manipulação única por 1 minuto, como descrito anteriormente. Após o procedimento de manipulação, os animais foram decapitados imediatamente.

Grupo manipulado (MR0): os animais foram manipulados durante os dez dias de vida. Ao décimo dia os animais foram decapitados imediatamente após a manipulação, sem serem devolvidos ao ninho.

Grupo manipulado-5 minutos (MR5): os animais foram manipulados durante os dez dias de vida. Ao décimo dia os animais foram manipulados, devolvidos ao ninho, a mãe devolvida à caixa e após 5 minutos, os filhotes foram decapitados, para coleta do sangue.

Grupo manipulado-10 minutos (MR10): os animais foram manipulados durante os dez dias de vida. Ao décimo dia os animais foram manipulados, devolvidos ao ninho, a mãe devolvida à caixa e após 10 minutos, os filhotes foram decapitados para coleta do sangue.

O sangue dos filhotes foi colocado em tubos previamente heparinizados e imediatamente centrifugados a 3000 RPM por 15 minutos. O plasma foi armazenado a -20° C para posterior radioimunoensaio para OT.

## **Experimento 2-Avaliação da resposta da ocitocina ao estresse em ratos submetidos à manipulação neonatal**

Ratos adultos, machos e fêmeas foram submetidos à canulação da jugular, na tarde anterior à coleta. Os animais foram anestesiados via intraperitoneal (ip) com tribromo etanol. A cirurgia foi feita com auxílio de uma agulha acoplada a uma cânula de silastic (Medicone) de aproximadamente 11 cm contendo solução salina 0,9% . A cânula foi inserida na jugular e suturada no músculo peitoral, para em seguida ser subcutaneamente externalizada na região do pescoço dos animais.

A coleta seriada de sangue foi realizada na manhã seguinte a cirurgia. O sangue foi coletado antes (Basal), 10 min, 30 e 60 minutos após os animais serem inseridos em um tubo contensor de acrílico. Amostras de 600 µl de sangue foram coletadas em seringas heparinizadas e a mesma quantidade de solução salina fisiológica 0,9% foi repostada imediatamente. O sangue foi centrifugado a 3000 RPM/15 min em centrífuga refrigerada e congelado para posterior radioimunoensaio para ocitocina.

### **Radioimunoensaio (RIA)**

O protocolo de RIA foi realizado de acordo com Caligioni & Franci (2002). Os plasmas coletados foram extraídos com éter de petróleo e acetona para posterior liofilização e dosagem por RIA Os reagentes utilizados foram anticorpos específicos (M. Morris, Wright State University, USA), hormônios iodados (J.A. Rodrigues, USP) e anticorpo secundário (C.R.Franci, USP).

### **Experimento 3-Avaliação dos neurônios produtores de ocitocina nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo em ratos adultos manipulados no período neonatal**

Ratos adultos, machos e fêmeas foram submetidos à perfusão transcardíaca com solução de lavagem tamponada e heparinizada, pH 7,4, seguida de paraformaldeído 4% (de acordo com Peinado et al, 1996) Os cérebros foram coletados e colocados em sacarose a 30%, para posterior congelamento em isopentano.

Após o congelamento, todos os cérebros foram seccionados no mesmo dia. Obtiveram-se secções de 50 µm nas regiões do PVN e SON (utilizando-se Paxinos & Watson, 1987)., em criostato a -20° C. As secções foram inseridas em containeres contendo PBS pH 7,4.

O procedimento de imunistoquímica ocorreu para todos os encéfalos ao mesmo tempo, isto é, 24 hs após o seccionamento. Foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido a 3%, em seguida lavagem com PBS -Triton a 0,4%. As secções foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-neurofisina associada à ocitocina (Monoclonal AntiBody PS38, gentilmente doado pelo Dr. Harold Gainer, NIH, EUA) a diluição de 1:50, overnight a 4°C. Após foi incubado com anticorpo anti-mouse biotilado (antimouse IgG, Vector) durante 2 hs. Em seguida foi aplicado às secções o complexo ABC (Vector Laboratories). A revelação ocorreu com solução de DAB (Sigma) e peróxido de hidrogênio (Merck). O controle positivo consistiu dos próprios núcleos e o controle negativo foi processado com ausência do anticorpo primário.

As secções foram lavadas, submetidas à desidratação por seqüência de álcoois e xilol e depois montadas em lâminas previamente gelatinizadas e cobertas com lamínulas e Entellan (Merck).

Para realizar a contagem do número dos neurônios foi utilizado um sistema-teste quadrado composto por linhas, previamente calibrado com lâmina objeto e com objetiva de 100X com área teste de X/Y 11960 µm<sup>2</sup> (Mandarim de Lacerda, 2003)

## **Experimento 4-Análise da quantidade de OT no PVN pelo método Western blotting, em ratos manipulados**

Os animais adultos, machos e fêmeas em diestro II foram decapitados e tiveram o encéfalo retirado e congelado em isopentano em gelo seco, posteriormente armazenados em freezer -70°C. O PVN foi microdissecado e coletado bilateralmente, de acordo com a técnica de Palkovits (1988). Obteve-se um homogeneizado com 50 µL de tampão de homogeneização contendo Tris e SDS. Determinou-se o conteúdo de proteína pelo método descrito por Bradford (1976). Posteriormente, quantidades iguais de proteína (35 µg para cada amostra) foram carregadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para separação de acordo com a sua mobilidade. Após, as proteínas foram eletrotransferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Amersham). A efetividade da separação das proteínas no gel e a sua transferência para a membrana foram verificadas. A seguir, feito o bloqueio de sítios inespecíficos, colocando-se a membrana em tampão salina Tween-Tris (TTBS; Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, 0,9% de cloreto de sódio e 0,1% de Tween 20) contendo albumina 5% por 2 horas em temperatura ambiente. Após o bloqueio a membrana foi incubada *overnight*, a 4°C, com anticorpo primário anti-neurofisina associada à ocitocina (Monoclonal AntiBody PS38, gentilmente doado pelo Dr. H. Gainer, NIH, EUA). Após o anticorpo primário, a membrana foi lavada em TTBS e incubada por 2 horas com o anticorpo secundário de cabra anti-mouse IgG, na concentração de 1:10000 diluído em TTBS. A membrana foi lavada novamente com TTBS e a imunorreatividade foi detectada pela alteração de quimioluminescência (ECL *Western blotting analysis system*, Amersham). A análise densitométrica dos filmes foi realizada com o auxílio do programa *MCID Image Analysis System* (versão 5.02, *Imaging Research*, Canadá).

### **Análise estatística**

Os resultados foram expressos através da média ± erro padrão da média (EPM), e o nível crítico fixado foi de 5% ( $p < 0,05$ ) para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa.

A comparação da ocitocina plasmática dos filhotes foi analisada por ANOVA de uma via. Já a resposta da ocitocina ao estresse nos ratos adultos foi analisada por ANOVA de uma via, utilizando-se tempo como medida repetida. Para a análise *pos hoc* utilizou-se o teste Newman-Keuls.

A comparação entre os grupos para o número de células imunorreativas a OT no PVN e SON em ratos e em ratas adultas no diestro foi realizada utilizando ANOVA de uma via, utilizando-se hemisfério como medida repetida. A expressão de OT no PVN foi analisada através do teste t de Student, comparando-se os manipulados com não-manipulados, separadamente para cada sexo.

## RESULTADOS

### **Experimento 1–Avaliação da concentração plasmática de OT em filhotes manipulados no período neonatal**

As figuras 10 A e B, mostram as concentrações plasmáticas de OT em filhotes, machos e fêmeas. Foram utilizados 5 grupos experimentais: não-manipulado (controle, NM); manipulação única 10° dia (MU), manipulação repetida no 10° dia imediatamente após a manipulação (MR0); manipulação repetida no 10° dia, 5 minutos após (MR5) e manipulação repetida 10 minutos após a manipulação (MR10). Em machos (figura 10A), foi observado efeito significativo para grupo [ $F(4,56)=4,89$ ;  $p=0,001$ ]. A análise *pos hoc* mostrou que os machos do grupo manipulado, 10 min após a manipulação apresentam níveis plasmáticos maiores. Em fêmeas (figura 10 B), foi observado efeito significativo para grupo [ $F(4,62)=4,5$ ;  $p=0,002$ ], a análise *pos-hoc* mostrou que os filhotes fêmeas dos grupos de manipulação repetida após 5 e 10 minutos, testados apresentam maiores níveis plasmáticos de ocitocina quando comparadas às fêmeas do grupo não-manipulado ou do grupo manipulação única. No entanto, as fêmeas que foram testadas imediatamente à manipulação apresentaram maior concentração plasmática do hormônio ( $p=0,05$ ). Porém, as fêmeas que foram manipuladas apenas no 10° dia pós-natal e foram decapitadas após a manipulação (manipulação única 10° dia) apresentaram concentrações de OT semelhantes às fêmeas não-manipuladas.

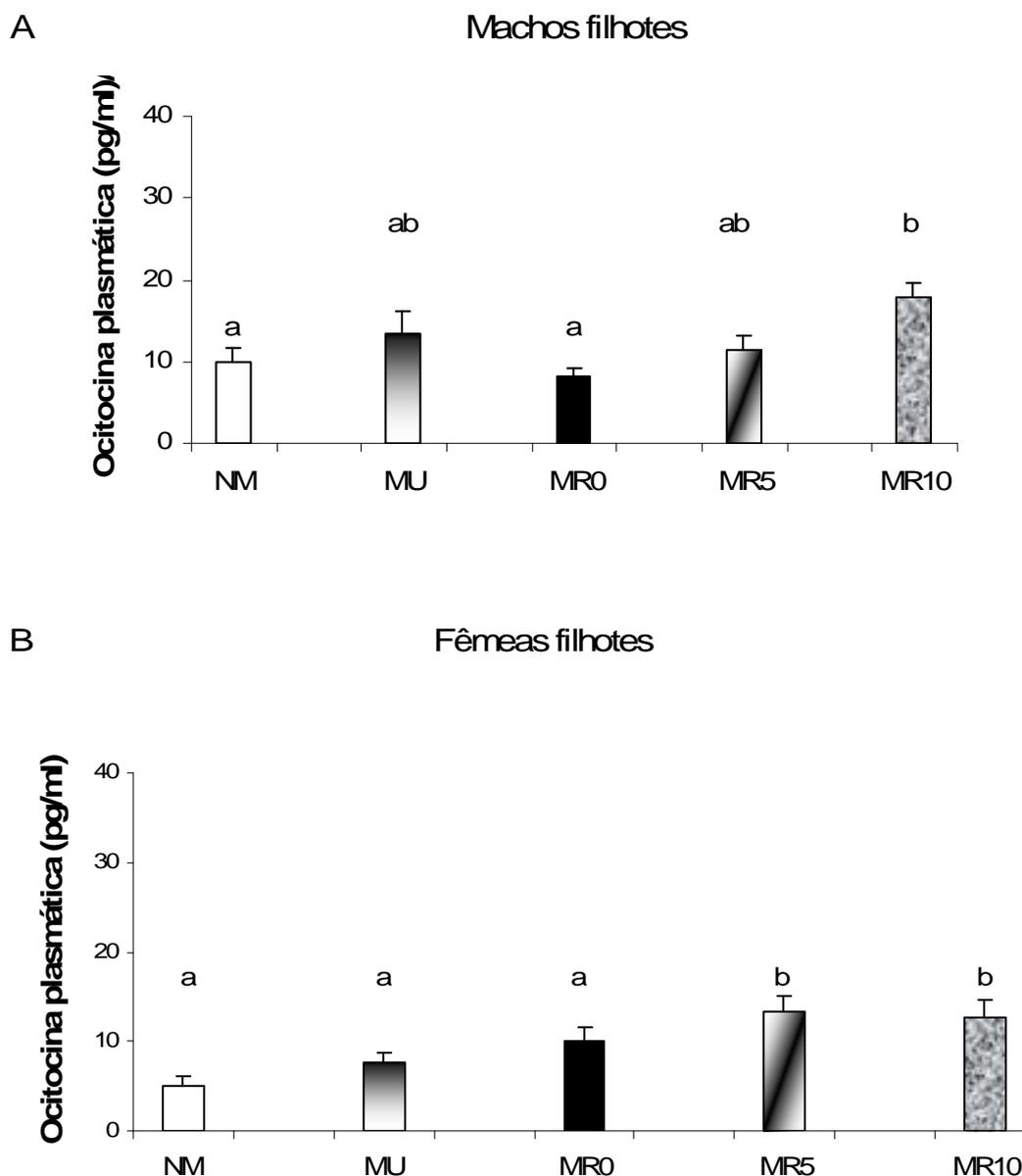


Figura 10. Ocitocina plasmática em filhotes aos 10 dias de idade, machos (A) e fêmeas (B). NM, filhotes não manipulados (n= 14); MU, única manipulação no 10° dia (n=13); MR0, plasma coletado imediatamente à manipulação (n=14); MR5, plasma coletado 5 minutos após a manipulação e devolução ao ninho (n=10); MR10, plasma coletado 10 minutos após a manipulação e devolução ao ninho (n=12). Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA, seguido de *Newman-Keuls*.

Para grupo a, b  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos não-manipulado, manipulação única e manipulados.

## **Experimento 2 – Avaliação da resposta da OT ao estresse por contenção em ratos adultos, machos e fêmeas, manipulados no período neonatal.**

A figura 11 representa a resposta da OT ao estresse por contenção, em ratos adultos. Em machos (FIG.11A), a ANOVA de uma via para medidas repetidas não mostrou efeito grupo [F(1,8), p=0,608]. Entretanto ocorreu um efeito tempo [F(3, 24), p=0,024]. A análise *pos hoc* mostrou um aumento significativo da concentração plasmática de OT aos 10 minutos do início da contenção. Nas ratas submetidas ao mesmo procedimento (fig. 11B), a ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferença significativa entre o grupo não-manipulado e o manipulado na secreção de OT [F(1,16)= 0,07, p=0,77], entretanto houve efeito tempo [F (3,54)=3,15, p=0,03] e interação [F(3,54)= 2,25, p=0,04]. A contenção causou um pequeno aumento da secreção de OT nas ratas não-manipuladas aos 10 minutos após o início do estresse, entretanto nas fêmeas manipuladas ocorreu um aumento diferente do basal somente aos 30 minutos após o início da contenção.

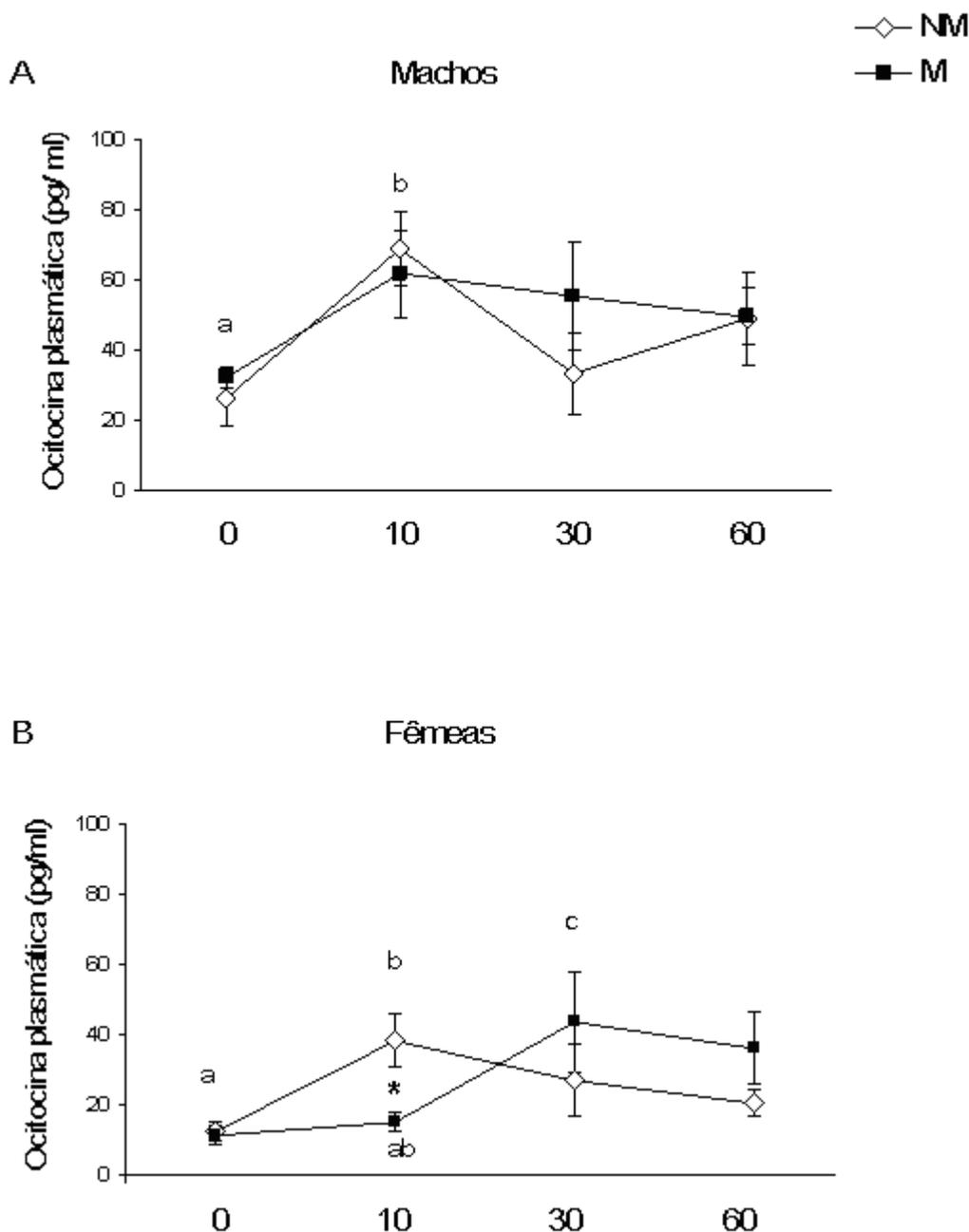


Figura 11. Concentração plasmática de OT em ratos adultos conscientes, submetidos ao estresse por contenção. 0=basal, antes do início da contenção; 10, aos 10 minutos do início da contenção; 30, aos 30 min; 60, aos 60 min. Machos (A) e fêmeas em diestro II (B). Os ratos são manipulados (M), submetidos à manipulação por 1 min/dia do primeiro ao décimo dias pós-natal ou não-manipulados (NM). Os dados expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA de uma via, tempo como medida repetida, seguido de *Newman-Keuls*. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos. a-b-c  $p < 0,05$ , para tempo.  $n = 7-11$  para cada grupo.

### **Experimento 3 – Avaliação dos neurônios produtores de ocitocina nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo em ratos adultos manipulados no período neonatal.**

A figura 12, 13 e 14 mostra o número de neurônios magnocelulares (maiores que 12  $\mu\text{m}$ ) e parvocelulares (menores que 12  $\mu\text{m}$ ) imunorreativos à OT no PVN, e no SON, respectivamente, por área teste (11960  $\mu\text{m}^2$ ) e por secção de cérebro, em machos adultos. A figura 12 mostra que não há diferenças no número de neurônios magnocelulares OT-positivos no PVN [ $F(1,10)=1,9$ ;  $p=0,19$ ], entretanto apresentaram uma tendência a interação [ $F(1,10)=4,04$ ;  $p=0,07$ ]. Os ratos manipulados possuem menos neurônios OT-positivos parvocelulares no PVN [ $F(1,10)=7,49$ ;  $p=0,02$ ] (figura 13). A figura 14 mostra os neurônios OT positivos no SON, onde não foi detectada diferença entre os grupos [ $F(1,10)=0,55$ ;  $p=0,47$ ].

As fêmeas estão representadas nas figuras 15, 16 e 17. No PVN, a análise mostrou efeito significativo lado [ $F(1,9)=9,6$ ;  $p=0,01$ ], sendo que os lados direito possuem maior número de células, mas não houve diferença entre o grupo não-manipulado e manipulado [ $F(1,9)=0,04$ ;  $p=0,84$ ] nos neurônios magnocelulares (fig.15). Também houve efeito grupo para as células parvocelulares no PVN, como mostrado na fig. 16 [ $F(1, 9)=15,18$ ;  $p=0,003$ ]. No SON (figura 17) de ratas fêmeas, a estatística apresentou uma tendência ao efeito lado [ $F(1,9)=3,67$ ;  $p=0,08$ ].

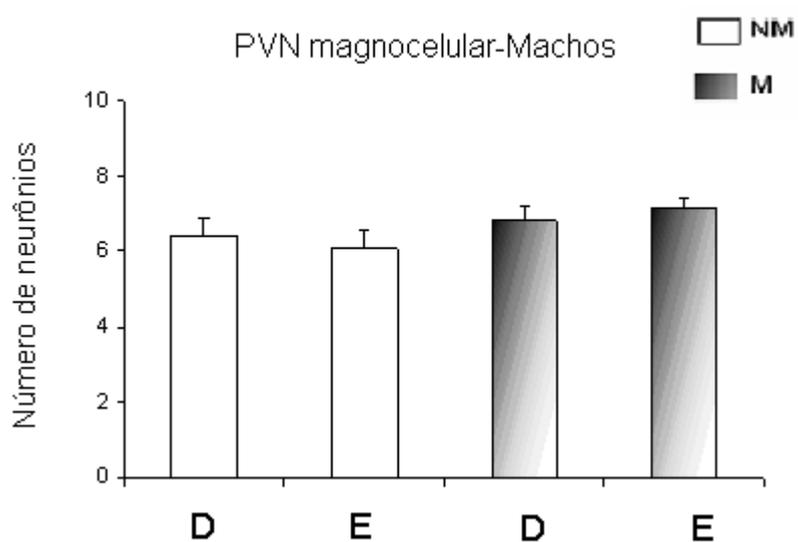


Figura 12. Número de células magnocelulares imunorreativas à OT por secção de cérebro, nos hemisférios direito (D) e esquerdo (E) do núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos adultos. NM, não-manipulados e M, manipulados no período neonatal. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via, hemisfério como medida repetida, seguido de *Newman-Keuls*.  $n = 6$  para ambos os grupos.

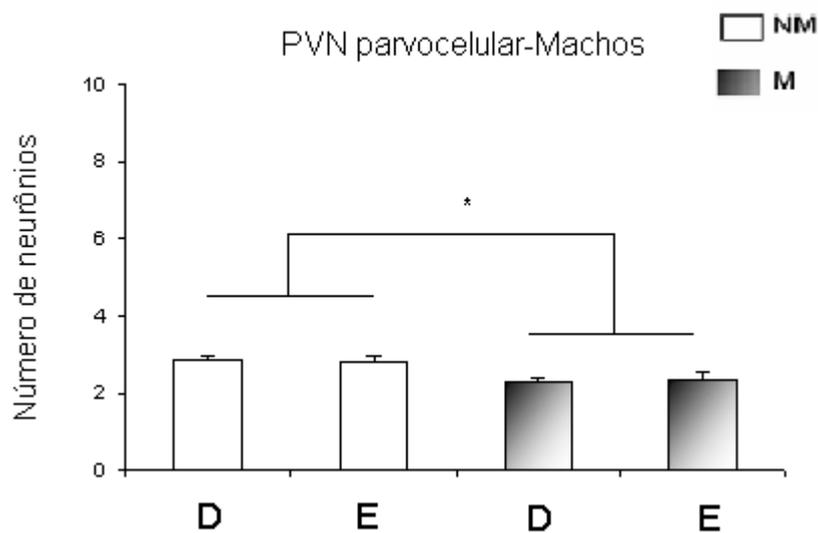


Figura 13. Número de células parvocelulares imunorreativas à OT por secção de cérebro, nos hemisférios direito (D) e esquerdo (E) do núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos adultos. NM, não-manipulados e M, manipulados. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via, hemisfério como medida repetida, seguido de *Newman-Keuls*.  $n = 6$  para ambos os grupos. Para grupo \*  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos não-manipulado e manipulados.

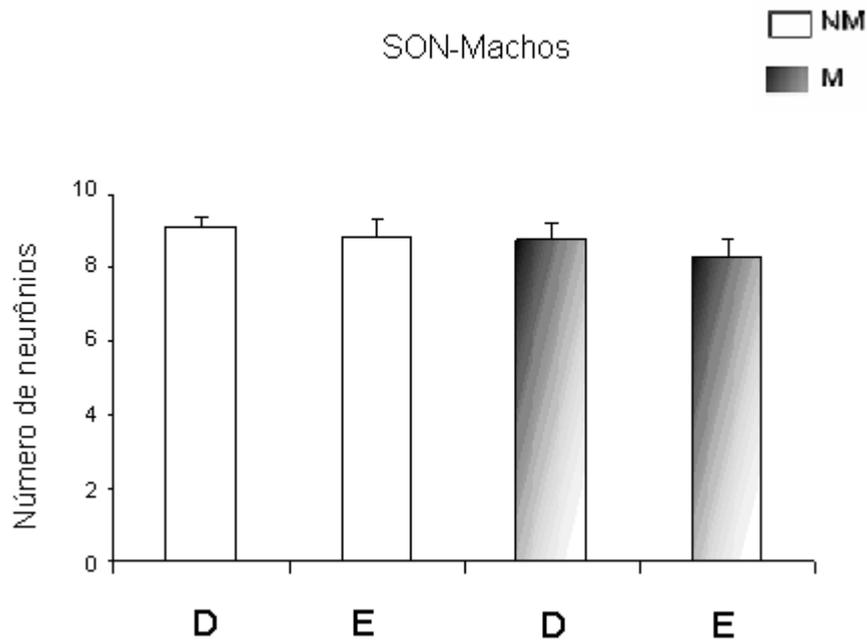


Figura 14. Número de células imunorreativas à OT por secção de cérebro, nos hemisférios direito (D) e esquerdo (E) do núcleo supraóptico do hipotálamo de ratos adultos. NM, não-manipulados e M, manipulados. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via, hemisfério como medida repetida, seguido de *Newman-Keuls*.  $n = 6$  para ambos os grupos.

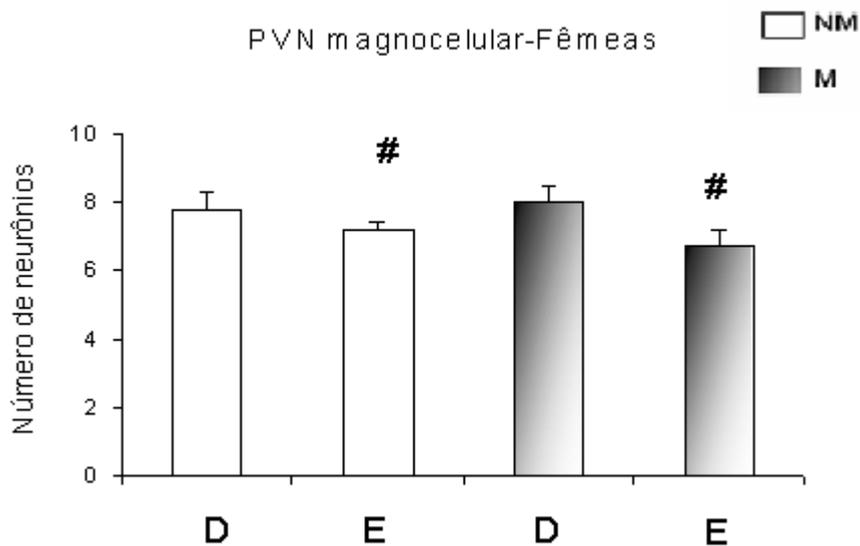


Figura 15. Número de células magnocelulares imunorreativas à OT por secção de cérebro, nos hemisférios direito (D) e esquerdo (E) do núcleo paraventricular do hipotálamo de ratas adultas (fêmeas). NM, não-manipulados e M, manipulados. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via, hemisfério como medida repetida, seguido de *Newman-Keuls*. Para hemisfério #  $p < 0,05$  quando comparados os lados direito e esquerdo.  $n = 5-6$  para ambos os grupos.

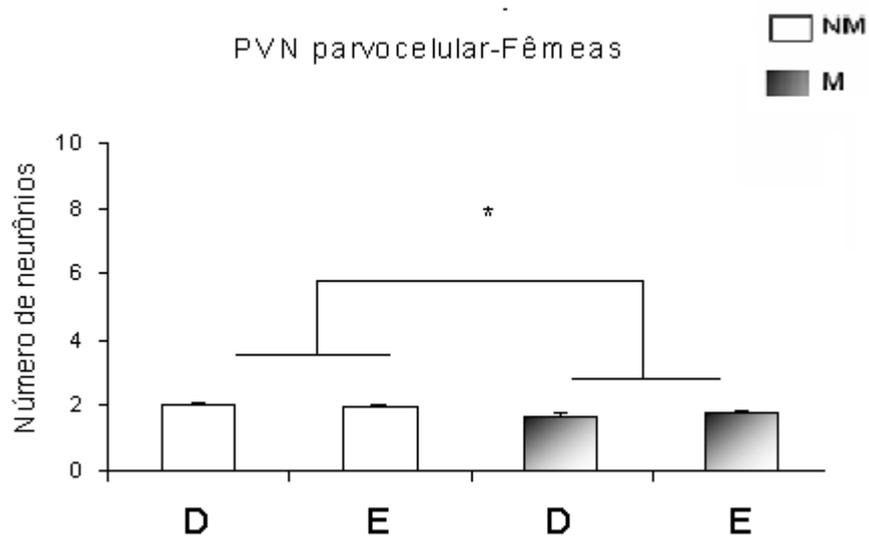


Figura 16. Número de células parvocelulares imunorreativas à OT por secção de cérebro, nos hemisférios direito (D) e esquerdo (E) do núcleo paraventricular do hipotálamo de ratas adultas (fêmeas). NM, não-manipulados e M, manipulados. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via hemisfério como medida repetida, seguido de *Newman-Keuls*.  $n=5-6$  para ambos os grupos.

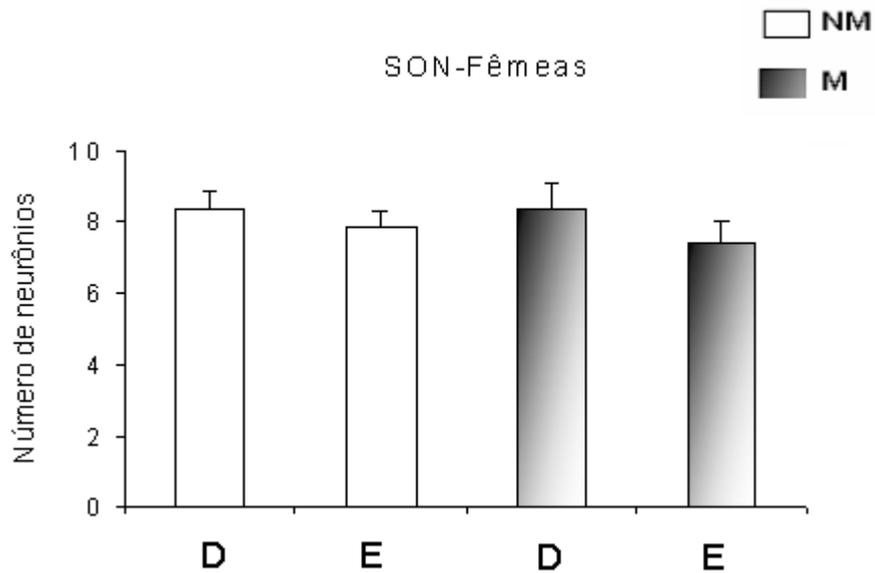


Figura 17. Número de células imunorreativas à OT por secção de cérebro, nos hemisférios direito (D) e esquerdo (E) do núcleo supraóptico do hipotálamo de ratas adultas (fêmeas). NM, não-manipulados e M, manipulados. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via, hemisfério como medida repetida, seguido de *Newman-Keuls*.  $n=5-6$  para ambos os grupos.

#### **Experimento 4 – Quantificação de OT no PVN pelo método Western blotting**

As figuras 18 A, B e C mostram a expressão de OT no PVN, em ratos adultos, machos, e ratas em diestro II. O teste t não detectou diferenças significativas entre os grupos, tanto em machos (fig. 18 B) [ $t(5)=0,49$ ;  $p=0,63$ ] como em fêmeas (fig.18C) [ $t(4)=0,30$ ;  $p=0,77$ ].

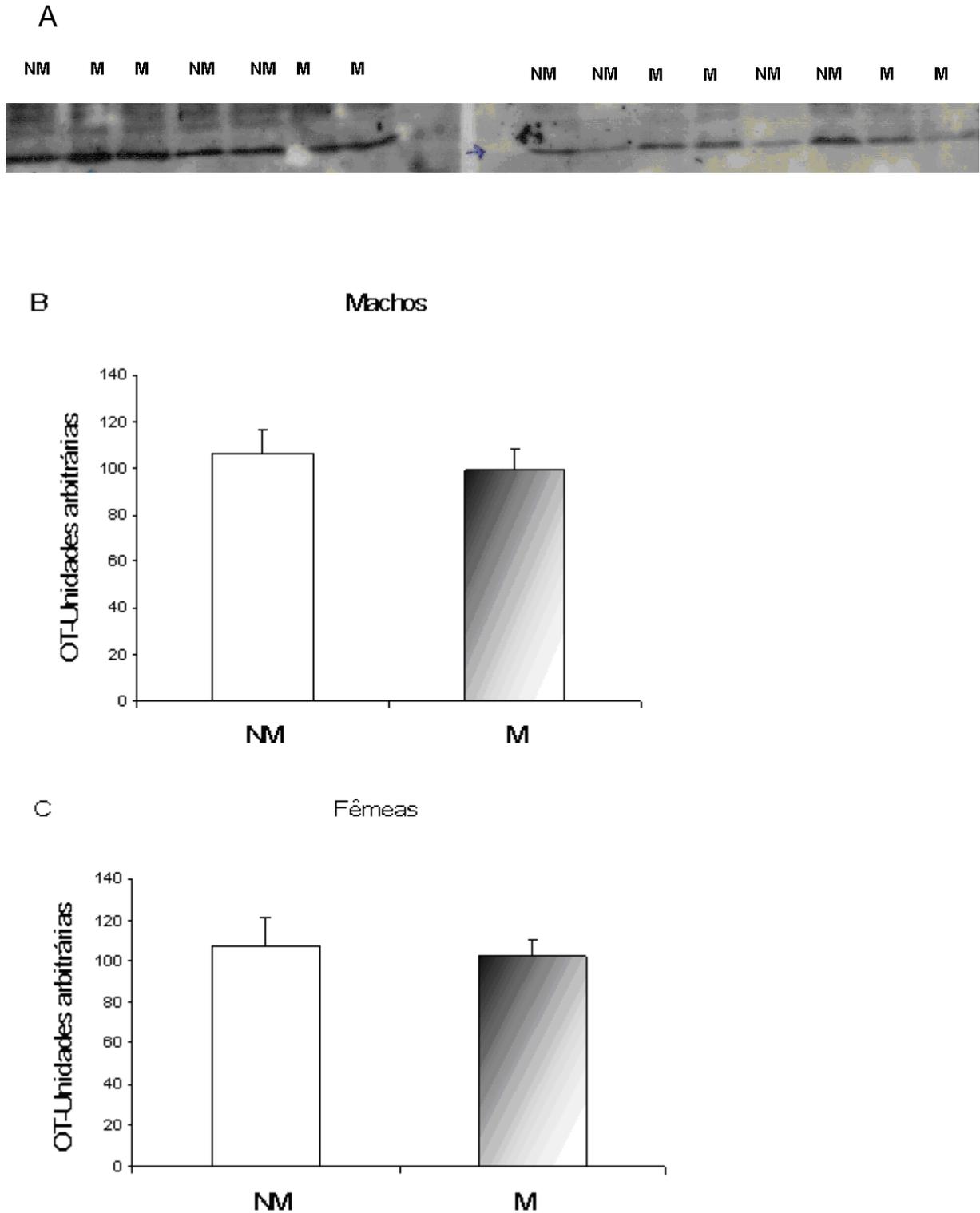


Figura 18. Expressão de OT no núcleo paraventricular de ratos adultos, manipulados (M) e não-manipulados (NM) obtida pela densidade óptica de OT detectada por *western blotting*, em machos (B), e fêmeas em diestro II. (C). Em (A), figura representativa dos *western blots* para OT. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando teste t de Student. n= 3-4 para ambos os grupos.

## DISCUSSÃO

Constatou-se que as interferências durante o período neonatal nas interações sociais do animal induzem alterações da atividade do sistema OTérgico em filhotes (Noonan et al, 1994), em adultos (Francis et al, 2000) e VPérgico (Veneema et al, 2006, 2007, Desbonnet et al, 2008), sendo assim, estas alterações por sua vez podem ter como conseqüências as mudanças comportamentais observadas durante a vida adulta. Mesmo uma breve separação da mãe durante este período, que é estressante para o filhote, pois ocorre interrupção da ligação mãe – filhote, induziu a uma alteração da ligação para OT no hipocampo já no oitavo dia (Noonan et al, 1994).

Neste trabalho, foram avaliados os níveis plasmáticos de OT em ratos de 10 dias de idade, não-manipulados e em ratos manipulados em diferentes momentos após a manipulação. Observamos que a manipulação induziu ao aumento na liberação plasmática de OT. Enquanto em machos, somente após 10 minutos da manipulação houve um aumento significativo da OT plasmática, em fêmeas o aumento da OT plasmática foi significativo aos 5 e 10 minutos e houve uma tendência ao aumento dos níveis plasmáticos imediatamente após a manipulação. O aumento da OT plasmática no grupo manipulado pode ser devido ao estresse sofrido pela manipulação ou à resposta da mãe, assim que os filhotes são devolvidos ao ninho, pois a mãe altera o comportamento maternal após os filhotes sofrerem algum tipo de intervenção, além disso, a mãe possui diferenças em relação ao comportamento maternal entre os filhotes machos e fêmeas (Moore & Morelli, 1979, Noonan et al, 1994, Francis & Meaney, 1999). Esta diferenciação do comportamento da mãe em relação aos filhotes pode ter sido a causa das diferenças apresentadas entre os filhotes machos e fêmeas. Sabe-se também que a OT (alguns estudos também sugerem a VP) é liberada em situações de experiências prazerosas, bem como em situações de estresse psicológico (Fries et al, 2005), e além disso, sugere-se um papel da OT no desenvolvimento neuronal em roedores, pois a injeção I.P. de OT no período neonatal induz a alterações na plasticidade neuronal (Carter, 2003, Yamamoto et al, 2002). Provavelmente o aumento além do normal dos níveis plasmáticos de OT induzida pela manipulação, alterou a plasticidade neuronal deste sistema quando adultos. Outros estudos

sugerem que a expressão dos receptores para OT é aumentada à medida que aumenta o comportamento maternal para com os filhotes (Champagne et al, 2001).

Alguns estudos avaliaram a liberação de OT em ratos durante o período neonatal, Sinding et al (1980a) analisaram a concentração hipotalâmica e na neuro-hipófise de ocitocina e vasopressina em ratos recém nascidos, determinando que na neuro-hipófise a concentração de OT é menor que a da VP e permanece baixa até o 8º dia de vida, esta concentração parece ser 1% dos níveis adultos. Os níveis fetais de OT somente são detectáveis a partir do 14º dia de gestação (Sinding et al, 1980b) e os níveis deste hormônio na neuro-hipófise já existem no dia do nascimento (Sinding et al, 1980c). Entretanto, até o sétimo dia após o nascimento o sistema hipotálamo-neuro-hipófise está imaturo (Choy & Watkins, 1979). Apesar de existirem dados controversos sobre as concentrações de OT na eminência mediana e na neuro-hipófise, aparentemente aos 10 dias de idade, nos ratos, este sistema já estaria maduro, sendo que o PVN e o SON atingem estágios diferentes de maturação durante o período neonatal (Choy & Watkins, 1979).

Após o parto, as ratas lactantes permanecem com altos níveis plasmáticos de OT, que além da liberação do leite parecem exercer efeitos antiestresse, diminuindo a produção de corticosterona e baixando a pressão arterial nas ratas lactantes. Em ratos e ovelhas possui a função de estabelecer ligações com os filhotes sendo liberada tanto na circulação como no sistema nervoso central (Uvnas-Moberg, 1998). Confirmando esse padrão, o bloqueio dos receptores de OT na amígdala central por OTA induziu ao aumento do comportamento agressivo maternal (Lubin et al, 2003).

Os tipos de estresse sofridos por um animal podem ser divididos em categorias, o físico e psicológico. Os hormônios neuro-hipofisários podem ser liberados durante as duas situações, entretanto pode haver uma dissociação entre a resposta endócrina e central (Onaka, 2004).

A OT é um hormônio que responde seletivamente ao estresse, alguns tipos causam a liberação plasmática, como por exemplo, estresses psicológicos como a imobilização ou contenção (Lang et al, 1983, Onaka, 2004, Dinan & Scott, 2005). O estresse por contenção induziu a liberação de OT na circulação tanto em machos como nas fêmeas. Nossos resultados mostraram que as fêmeas manipuladas aparentemente têm um atraso na liberação plasmática da OT no estresse por contenção, enquanto nos machos não houve diferenças entre os grupos. Alguns estímulos parecem dissociar a liberação plasmática da liberação central da OT, em machos submetidos ao estresse por agressividade por outro macho induziu a liberação intra-hipotalâmica de OT, sem alterar a concentração plasmática (Engelmann et al, 1999). Além

disso, foi reportado dimorfismo sexual na resposta da OT ao estresse, sendo que a resposta das fêmeas é maior que a dos machos (Carter et al, 1988).

Alguns hormônios sensíveis a estresse são afetados pela manipulação neonatal. Severino et al (2004) demonstraram que ratas manipuladas em diestro II apresentam uma redução da resposta da prolactina ao estresse. Em várias espécies que há diferenças entre os sexos nas respostas do eixo HPA ao estresse e talvez seja devido à influência dos esteróides sexuais (para revisão, Tilbrook & Clarke, 2006). Aparentemente a manipulação neonatal não exerce efeito sobre a liberação plasmática da OT em machos, apresentando um efeito sexualmente dimórfico neste sistema.

A OT, bem como a VP, está intimamente relacionada com a comunicação social em animais (Fries et al, 2005). Em ratos observou-se que a OT aumenta a expressão de alguns comportamentos, por exemplo sexual e maternal (Onaka, 2004). Estudos anteriores mostraram que a manipulação neonatal diminui o número total de neurônios em duas regiões, no Locus coeruleus (Lucion et al, 2003) e na porção parvocelular do PVN (Winkelmann-Duarte et al, 2007). Neste trabalho detectamos que a manipulação neonatal não alterou o número de neurônios magnocelulares OTérgicos em ratos machos ou fêmeas, entretanto induziu a redução nos neurônios parvocelulares OTérgicos, em ratos adultos. Também não observamos diferenças na quantidade de OT total no PVN nos animais manipulados em relação aos não-manipulados, entretanto pudemos observar uma redução em um dos parâmetros de comportamentos sociais nos machos, como a redução do comportamento de cheirar em dois testes comportamentais, podendo ser relacionado à diminuição da quantidade de neurônios ocitocinérgicos induzidos pela manipulação neonatal. Neste sentido, humanos psicóticos e autistas apresentam níveis plasmáticos menores de OT (Modahl et al, 1998, Goldman et al, 2008). Entretanto não houve correlação entre níveis plasmáticos de OT em pacientes deprimidos, mesmo assim, está estabelecida a relação da OT com a regulação do eixo HPA, que está hiperativo em indivíduos com desordens de humor e afetivas (Scantamburlo et al. 2007), por isto a importância de se estudar o efeito das alterações no período neonatal sobre o sistema ocitocinérgico e seus possíveis efeitos na vida adulta.

A expressão da OT no PVN, quantificada por western blotting e comparada entre os animais manipulados e não-manipulados não apresentou diferenças tanto em machos como em fêmeas, bem como o número de neurônios magnocelulares imunorreativos a OT, tanto no PVN como no SON. Além da liberação plasmática, também foi demonstrado que alguns tipos de estresse emocionais induzem a liberação hipotalâmica de OT através da liberação somatodendrítica, característica destes neurônios (Engelmann et al, 1999). Não se pode

determinar a origem do peptídeo quantificada através do western blotting, se pertence ao fluido extracelular, ou contida nas células, sendo que dependendo do estímulo os neurônios do PVN e SON podem coordenar a liberação do peptídeo dos dendritos ou dos terminais axônicos na neuro-hipófise simultaneamente ou separadamente (Neumann, 2007).

Neste trabalho, constatou-se que o lado esquerdo possui menos neurônios magnocelulares OTérgicos em fêmeas tanto no PVN, e no lado direito há uma tendência a apresentar mais neurônios também no SON. Não foram encontradas assimetria no número total de neurônios magnocelulares nestas duas regiões em estudo prévio (Winkelmann-Duarte et al, 2007). Nossos resultados apontam para a lateralização dos neurônios OT tanto em ratas não-manipuladas como nas manipuladas, ao contrário de Sullivan & Dufresne (2006) que demonstraram que a manipulação neonatal induziu a lateralização do sistema regulatório do eixo HPA.

Entretanto foi demonstrado que ocorre assimetria no sistema neuroendócrino em estruturas relacionadas à reprodução, ocorre no hipotálamo, demonstrada pelas diferentes quantidades de GnRH nos hemisférios direito e esquerdo em ratas com ovários intactos e ratos e maior densidade de neurônios GnRH positivos no hemisfério direito em camundongos (Gerendai & Halasz, 2001). A lateralização ocorre também em seres humanos, sendo o hemisfério direito maior que o esquerdo e está presente desde o nascimento (Gilmore et al, 2007).

## **Conclusões**

No estudo sobre os efeitos da manipulação neonatal sobre a liberação da OT em filhotes e em adultos, e sobre a OT no SNC conclui-se que o sistema OTérgico parece ser sensível a interferências ambientais nos primeiros dias de vida. Em filhotes, a manipulação neonatal serviu como estímulo para aumentar a liberação plasmática da OT, comparada a filhotes não-manipulados.

Em fêmeas adultas, submetidas ao estresse por imobilização, considerado um estressor psicológico e um forte indutor da liberação da OT, observa-se que a manipulação atrasou a liberação deste hormônio na circulação, entretanto em machos não observou-se efeitos sobre a liberação plasmática.

Não constatou-se efeitos sobre os principais neurônios produtores de OT no PVN e SON, os magnocelulares, entretanto demonstrou-se uma diminuição em neurônios parvocelulares imunorreativos à OT, em ratos adultos, podendo ser uma das causas das diferenças em comportamentos sociais já descrita nos animais que foram submetidos à manipulação na infância. Também podemos concluir que a expressão de OT no PVN não parece ser alterada pela manipulação neonatal, pois não foi possível detectar diferenças na quantidade de OT no PVN pelo método utilizado.

## CAPÍTULO 3

EFETOS DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A  
LIBERAÇÃO E SOBRE A PRODUÇÃO CENTRAL DA  
VASOPRESSINA

## INTRODUÇÃO

### Vasopressina

A vasopressina (VP) é sintetizada nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo. Dois tipos de neurônios são responsáveis pela síntese de VP, os parvocelulares e magnocelulares. Os neurônios magnocelulares encontram-se no PVN e SON e projetam seus axônios para a neuro-hipófise. Já os neurônios parvocelulares encontrados na divisão parvocelular do PVN projetam para a eminência mediana, sendo assim a VP também é secretada na circulação portal (Treschan & Peters, 2006).

O gene codificador da VP contém 3 exons, intercalados por 2 introns e localiza-se no mesmo cromossomo onde é codificada a ocitocina (OT), entretanto a transcrição ocorre no sentido oposto. No camundongo localiza-se cromossomo 2 e em humanos, no cromossomo 20. Sua estrutura de 9 aminoácidos difere em somente dois, da estrutura da OT. Sintetizada como um pré-pro-hormônio, que consiste no peptídeo sinalizador, no nonapeptídeo e na neurofisina associada (neurofisina II) (para revisão, Caldwell et al, 2008). Em ratos, os neurônios vasopressinérgicos são originados de células precursoras localizadas na porção dorsal do III ventrículo, antes do nascimento, e os neurônios do SON desenvolvem-se antes do que no PVN. Nos humanos já se encontram neurônios no PVN e SON por volta do final do terceiro mês de gestação (para revisão, Ugrumov, 2002). Em ratos, observou-se níveis hipofisários detectáveis de VP somente a partir do 14º dia de gestação (Sinding et al, 1980a).

Os principais estímulos que induzem a liberação da VP são o aumento da osmolalidade no sangue, diminuição da pressão arterial e diminuição da volemia (Treschan & Peters, 2006). Sua principal função no rim é aumentar a reabsorção de água nos ductos coletores renais, sendo também conhecida como hormônio antidiurético (ADH). A VP é sensível a pequenas variações na osmolalidade plasmática. Os estímulos que induzem a sua liberação no hipotálamo são ativados através de receptores localizados em osmorreceptores localizados em vasos portais e mesentéricos e a queda de pressão sentida nos baroreceptores atriais e arteriais também induzem a liberação de VP (Petersen, 2006). Vários eventos estressantes servem como estímulos para a liberação de VP e compreendem alterações na volemia, sendo assim, os estressantes envolvendo estas mudanças, como hemorragia, aumentam os níveis de VP circulantes. Além disso, alguns estudos sugerem que a VP pode ser liberada em situações de estresse não-osmótico, apesar de não haver um consenso, outros estímulos estressantes, que

não volêmicos, como os psicológicos, tais como imobilização, ambientes novos, nado forçado, choque, não parecem induzir a liberação plasmática de VP, embora induzam a liberação de OT (Jezova et al, 1995; Wotjak et al, 1998; Laguna-abreu, 2004). Entretanto ocorre liberação de VP no PVN e SON após estresse por nado forçado, sugerindo uma dissociação da resposta central e periférica da vasopressina ao estresse (Wotjak et al, 1998). Apesar da ausência de liberação periférica da VP no plasma, a origem da VP liberada no PVN parece ser de origem magnocelular predominantemente (Wotjak et al, 2001).

Os receptores para VP são receptores acoplados a proteína G e consistem de 3 subtipos, V1a, V1b e V2, também conhecidos como VR1, VR2 e VR3.

Os receptores V1a são encontrados em músculo liso vascular, fígado, útero e córtex adrenal, enquanto os V2 são encontrados nos ductos coletores renais. Os do tipo V1b são encontrados na adeno-hipófise onde regulam a liberação da corticotrofina (ACTH). No SNC os receptores V1a são encontrados inclusive no PVN (Dinan & Scott, 2005; Petersen, 2006). Os neurônios vasopressinérgicos expressam desde o nascimento os receptores V1a e V1b e a auto-regulação ocorre através do V1a (Ugrumov, 2002).

A vasopressina também possui um papel importante na regulação da resposta ao estresse. O eixo HPA é regulado por dois principais hormônios, o CRH e a VP. A VP age sinergicamente com o CRH (Stratakis & Chrousos, 1995) e juntamente com o CRH facilita a liberação do ACTH na adeno-hipófise. Os neurônios parvocelulares que liberam VP na circulação portal possivelmente co-expressam tanto CRH como VP. A maioria dos neurônios VP positivos que acessam a circulação portal são oriundos do PVN, entretanto alguns estudos mostram que podem também ser originados do SON (Dinan & Scott, 2005). Estímulos estressantes induzem não somente a ativação do eixo HPA, mas também o eixo hipotálamo-neuro-hipófise (HNN), sendo que a VP pode ser liberada tanto axonalmente como somatodendriticamente em resposta a alguns estímulos. Dessa forma, eventos estressantes podem induzir não somente a ativação do eixo HPA, mas também do eixo HNN (Engelmann et al, 2006).

Em ratos foi descrito a ocorrência de receptores para VP em várias regiões do SNC, como área septal lateral, hipocampo, área amígdalo-estriatal, núcleo da base da estria terminal e regiões do hipotálamo, e através dos receptores localizados nestas áreas límbicas podem mediar comportamentos (Ruscio et al, 2007; Caldwell et al, 2008). Estudos em roedores demonstraram que algumas funções centrais da VP (conjuntamente com a OT) relacionam-se com comportamentos sociais. Deste modo, a VP parece estar relacionada na modulação de

comportamentos como a agressão entre machos, no comportamento agressivo em lactantes, reconhecimento de odores e preferência na escolha de parceiros (Caldwell et al, 2008).

Entre os comportamentos mais estudados destaca-se o papel da VP na memória social em roedores. A VP é de fundamental importância em um tipo específico de memória baseada em sinais olfatórios: a memória social ou reconhecimento social. Injeções centrais e periféricas de VP demonstram claramente que a VP tem função importante no reconhecimento social em roedores. A VP quando injetada em algumas regiões, por exemplo, área septal, resulta em uma melhora da memória social, enquanto o antagonista injetado na mesma região prejudica o reconhecimento. Os receptores V1a e V1b relacionam-se com a memória social, entretanto a maioria dos parâmetros comportamentais da memória social são mediados pelo V1a. Além disso, estimulação elétrica do PVN e SON induzindo a liberação deste peptídeo também mostrou melhora na memória social. O bloqueio dos receptores V1a por antagonistas injetado centralmente impede o reconhecimento (Bielsky & Young, 2004). Ratos brattleboro mutantes deficientes em VP apresentam déficits neste tipo memória (Engelmann & Landgraf, 1994).

A ativação do eixo HPA em situações de estresse é uma resposta normal do organismo, entretanto algumas patologias como por exemplo a depressão podem ser causadas por um desequilíbrio no eixo HPA e por alterações no padrão de secreção da VP (Dinan & Scott, 2005). A vasopressina também pode exercer um papel inibitório no comportamento sexual em ratas, pois quando injetada centralmente, inibe o comportamento sexual quando expostas a um macho sexualmente ativo (Pedersen & Boccia, 2006).

A VP parece estar relacionada à ansiedade. Ratos geneticamente selecionados com alta ansiedade apresentam uma hiperresponsividade do eixo HPA e maior expressão da vasopressina no PVN (Bosch et al, 2006). Em humanos, altos níveis plasmáticos de VP estão associados a desordens de estresse pós-traumático e psicoses (de Kloet et al, 2008, Goldman et al, 2008).

## **JUSTIFICATIVA**

A VP tem sido descrita por seu papel em comportamentos agressivos, memória social, e modulação da ansiedade, mas principalmente na modulação do eixo HPA e por agir em estruturas extrahipotalâmicas (Engelmann et al, 2006, Veneema et al, 2006, Tillbrok & Clarke, 2006). Os animais manipulados na infância possuem uma menor reatividade do eixo HPA, manifestado pela menor secreção de hormônios relacionados ao estresse, efeitos observados principalmente na vida adulta.

Sendo assim a justificativa deste trabalho é a de tentar avaliar até que ponto a manipulação neonatal que tem sido amplamente estudada por suas alterações no eixo HPA pode influenciar a plasticidade e liberação de neuropeptídeos importantes na regulação do estresse, como a vasopressina.

## **Objetivo**

Este trabalho tem o objetivo de investigar os efeitos induzidos pela manipulação neonatal ao sistema vasopressinérgico. Os objetivos são:

Estudar (1) a liberação plasmática de VP em filhotes manipulados e não-manipulados durante o período neonatal; (2) a resposta plasmática da VP ao estresse em ratos adultos (3) a distribuição dos neurônios VP magnocelulares no PVN e SON e parvocelulares no PVN em ratos adultos e (4) a quantidade de VP no PVN em ratos adultos, machos e fêmeas em diestro.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Experimento 1-Avaliação da concentração plasmática da VP em filhotes de 10 dias manipulados durante o período neonatal**

Ratos filhotes, machos e fêmeas no décimo dia de vida foram decapitados, para posterior coleta do sangue do tronco nas seguintes condições:

Grupo não-manipulado (controle): os animais foram retirados do ninho e imediatamente decapitados.

Grupo manipulação única: filhotes do grupo não-manipulado, no décimo dia de vida foram submetidos à manipulação única por 1 minuto, como descrito anteriormente. Após o procedimento de manipulação, os animais foram decapitados imediatamente.

Grupo manipulado: os animais foram manipulados durante os dez dias de vida. Ao décimo dia os animais foram decapitados imediatamente após a manipulação, sem serem devolvidos ao ninho.

Grupo manipulado-5 minutos: os animais foram manipulados durante os dez dias de vida. Ao décimo dia os animais foram manipulados, devolvidos ao ninho, a mãe devolvida à caixa e após 5 minutos, os filhotes foram decapitados, para coleta do sangue.

Grupo manipulado-10 minutos: os animais foram manipulados durante os dez dias de vida. Ao décimo dia os animais foram manipulados, devolvidos ao ninho, a mãe devolvida à caixa e após 10 minutos, os filhotes foram decapitados para coleta do sangue.

O sangue dos filhotes foi colocado em tubos previamente heparinizados e imediatamente centrifugados a 3000 RPM por 15 minutos. O plasma foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior radioimunoensaio para vasopressina.

### **Experimento 2-Avaliação da resposta da vasopressina ao estresse em ratos submetidos à manipulação neonatal**

Ratos adultos, machos e fêmeas foram submetidos à canulação da jugular, na tarde anterior à coleta. Os animais foram anestesiados com tribromo etanol. Com auxílio de uma agulha acoplada a uma cânula de silastic (Medicone) de aproximadamente 11 cm contendo

solução salina 0,9% a cânula foi inserida na jugular e suturada no músculo peitoral, para em seguida ser subcutaneamente externalizada na região do pescoço dos animais.

A coleta seriada de sangue foi realizada na manhã seguinte a cirurgia. O sangue foi coletado antes (Basal), 5 min, 10 min, 30 e 60 minutos após os animais serem inseridos em um tubo contensor de acrílico. Amostras de 600 µl de sangue foram coletadas em seringas heparinizadas e a mesma quantidade de solução salina fisiológica 0,9% foi repostada em seguida. O sangue foi centrifugado a 3000 RPM por 15 min em centrífuga refrigerada e congelado para posterior radioimunoensaio para VP.

### **Experimento 3- Avaliação dos neurônios produtores de vasopressina nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo em ratos adultos manipulados no período neonatal**

Ratos adultos, machos e fêmeas foram submetidos à perfusão transcardíaca com solução de lavagem tamponada e heparinizada, pH 7,4, seguida de paraformoldeído 4% (Peinado et al, 1996). Os cérebros foram então retirados do crânio e colocados em solução de sacarose a 30%, para posterior congelamento em isopentano e gelo seco. Após congelamento, todos os cérebros foram seccionados em criostato a -20°C, no mesmo dia. Obtiveram-se secções de 50 µm nas regiões do PVN e SON. As secções foram inseridas em containers contendo PBS pH 7,4.

O procedimento de imunistoquímica ocorreu ao mesmo tempo para todos os encéfalos, isto é, 24 hs após o seccionamento. Foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido a 3%, em seguida lavagem com PBS -Triton a 0,4%. As secções foram incubadas com anticorpo policlonal anti-neurofisina associada à vasopressina (Monoclonal AntiBody PS41, gentilmente doado pelo Dr. Harold Gainer, NIH, EUA) a diluição de 1:50, overnight a 4°C. Após foi incubado com anticorpo anti-mouse biotilado (antimouse IgG, Amersham Life Science) durante 2 hs. Em seguida foi aplicado as secções complexo ABC (VECTOR Laboratories), e revelado com DAB (Sigma) e peróxido de hidrogênio (Merck). O controle positivo consistiu dos próprios núcleos e o controle negativo foi processado com ausência do anticorpo primário.

As secções foram lavadas, submetidas à desidratação por seqüência de álcoois e xilol e depois montadas em lâminas previamente gelatinizadas e cobertas com lamínulas e Entellan (Merck).

A contagem do número dos neurônios foi utilizada um sistema-teste quadrado composto por linhas, previamente calibrado com lâmina objeto e com objetiva de 100X com área total de X/Y 11 960 $\mu\text{m}^2$  (Mandarim de Lacerda, 2003).

#### **Experimento 4 - Avaliação da quantidade de VP no PVN pelo método Western blotting, em ratos manipulados**

Os animais adultos, machos e fêmeas em diestro II foram decapitados e tiveram o encéfalo retirado e congelado em isopentano em gelo seco, posteriormente armazenados em freezer -70°C. O PVN foi microdissecado e coletado bilateralmente, de acordo com a técnica de Palkovits (1988). Obteve-se um homogeneizado com 50  $\mu\text{L}$  de tampão de homogeneização com inibidores de proteases (NaCl, Tris, EDTA, Glicerol). Desse homogeneizado determinou-se o conteúdo de proteína pelo método descrito por Bradford (1976). Posteriormente, quantidades iguais de proteína (35  $\mu\text{g}$  para cada amostra) foram carregadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para separação de acordo com a sua mobilidade. Após, as proteínas foram eletrotransferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Amersham). A efetividade da separação das proteínas no gel e a sua transferência para a membrana foram verificadas. A seguir, feito o bloqueio de sítios inespecíficos, em tampão salina Tween-Tris (TTBS; Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, NaCl 0,1% de Tween 20) contendo albumina 5% por 2 horas em temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight*, a 4°C, com anticorpo primário anti-vasopressina (Monoclonal AntiBody PS 41, doado pelo Dr. Harold Gainer, NIH, EUA). Após o anticorpo primário, a membrana foi lavada em TTBS e incubada por 2 horas com o anticorpo secundário de cabra anti-mouse IgG, na concentração de 1:10000 diluído em TTBS. A membrana foi lavada novamente com TTBS e a imunorreatividade foi detectada pela alteração de quimioluminescência (ECL *Western blotting analysis system*, Amersham). A análise densitométrica dos filmes foi realizada com o auxílio do programa *MCID Image Analysis System* (versão 5.02, *Imaging Research*, Canadá).

## **Análise estatística**

Os resultados foram expressos através da média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e o nível crítico fixado foi de 5% ( $p < 0,05$ ) para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significativa.

A comparação dos níveis plasmáticos de VP nos filhotes foi analisada por ANOVA de uma via. Já a resposta da VP ao estresse nos ratos adultos foi analisada por ANOVA de uma via, utilizando-se tempo como medida repetida. Para a análise *pos hoc* foi utilizado o teste Newman-Keuls.

A comparação entre os grupos para o número de células imunorreativas a VP no PVN e SON em ratos e em ratas adultas no diestro foi realizada utilizando ANOVA de uma via, utilizando-se hemisfério como medida repetida. A quantificação de VP no PVN foi analisada através do teste t de Student, comparando-se os manipulados com não-manipulados, separadamente para cada sexo.

## RESULTADOS

### **Experimento 1–Avaliação da concentração plasmática de VP em filhotes manipulados no período neonatal**

A figura 19 mostra as concentrações plasmáticas de VP de filhotes, machos e fêmeas. Foram utilizados 5 grupos experimentais: não-manipulado (controle, NM); manipulação única 10º dia (MU), manipulação repetida no 10º dia imediatamente após a manipulação (MR0); manipulação repetida no 10º dia, 5 minutos após (MR5) e manipulação repetida 10 minutos após a manipulação (MR10). Em machos (figura 19 A), não foi observado efeito significativo para grupo [F (4,54)=2,02 , p=0,10]. Em fêmeas (figura 19 B), não foi observado efeito significativo para grupo [F(4,51)=2,112; p=0,0928].

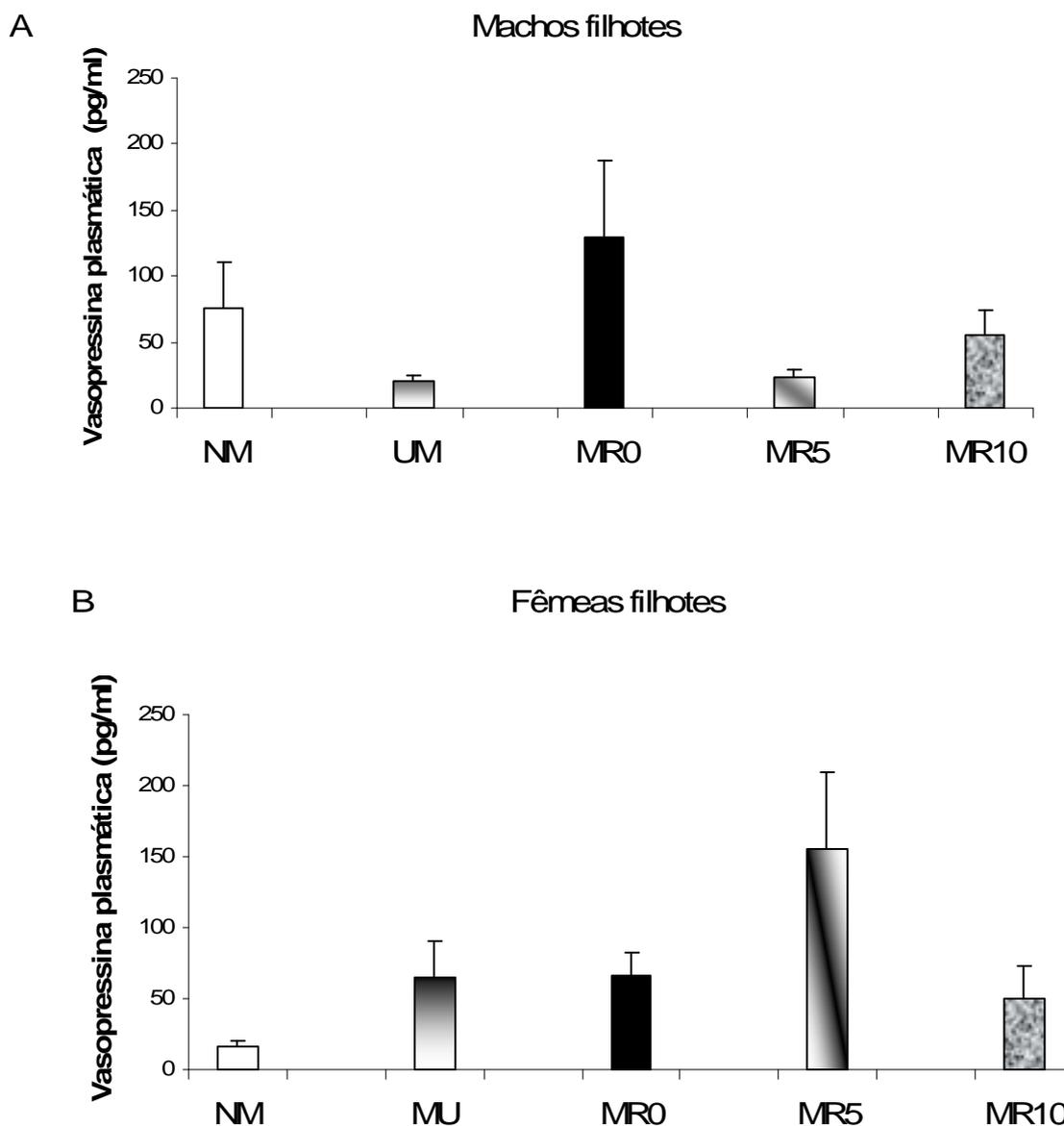


Figura 19. Vasopressina plasmática em filhotes aos 10 dias de idade, machos (a) e fêmeas (b). NM, filhotes não manipulados (n= 14); MU, única manipulação no 10º dia (n=13); MR, plasma coletado imediatamente à manipulação (n=14); M5, plasma coletado 5 minutos após a manipulação e devolução ao ninho (n=10); M10, plasma coletado 10 minutos após a manipulação e devolução ao ninho (n=12). Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA, seguido de *Newman-Keuls*.

Para grupo  $*p < 0,05$  quando comparado aos grupos não-manipulado, manipulação única e manipulados.

## **Experimento 2 – Avaliação da resposta da VP ao estresse por contenção em ratos adultos, machos e fêmeas, manipulados no período neonatal.**

As figuras 20 A e B representam a resposta da VP ao estresse por contenção, em ratos adultos. Em machos (fig. 20 a), a ANOVA de duas vias para medidas repetidas não mostrou efeito grupo [ $F(1,14)=0,02$ ,  $p=0,8$ ]. Entretanto ocorreu um efeito tempo [ $F(4, 56)=32,99$ ,  $p=0,02$ ]. A análise *pos hoc* mostrou um aumento significativo da concentração plasmática de VP aos 10 minutos do início da contenção, os valores retornaram a níveis semelhantes aos níveis basais nas coletas subseqüentes, 30 e 60 minutos. Nas ratas submetidas ao mesmo procedimento (fig. 20 B), a ANOVA de uma via para medidas repetidas mostra que não houve diferença significativa entre o grupo não-manipulado e o manipulado na secreção de VP [ $F(1,20)=0,2$ ,  $p=0,65$ ], entretanto houve efeito tempo [ $F(4,80)=3,85$ ,  $p=0,006$ ]. A contenção causou um pequeno aumento da secreção de VP em ambos os grupos aos 10 minutos em machos e aos 5 minutos nas fêmeas após o início do estresse.

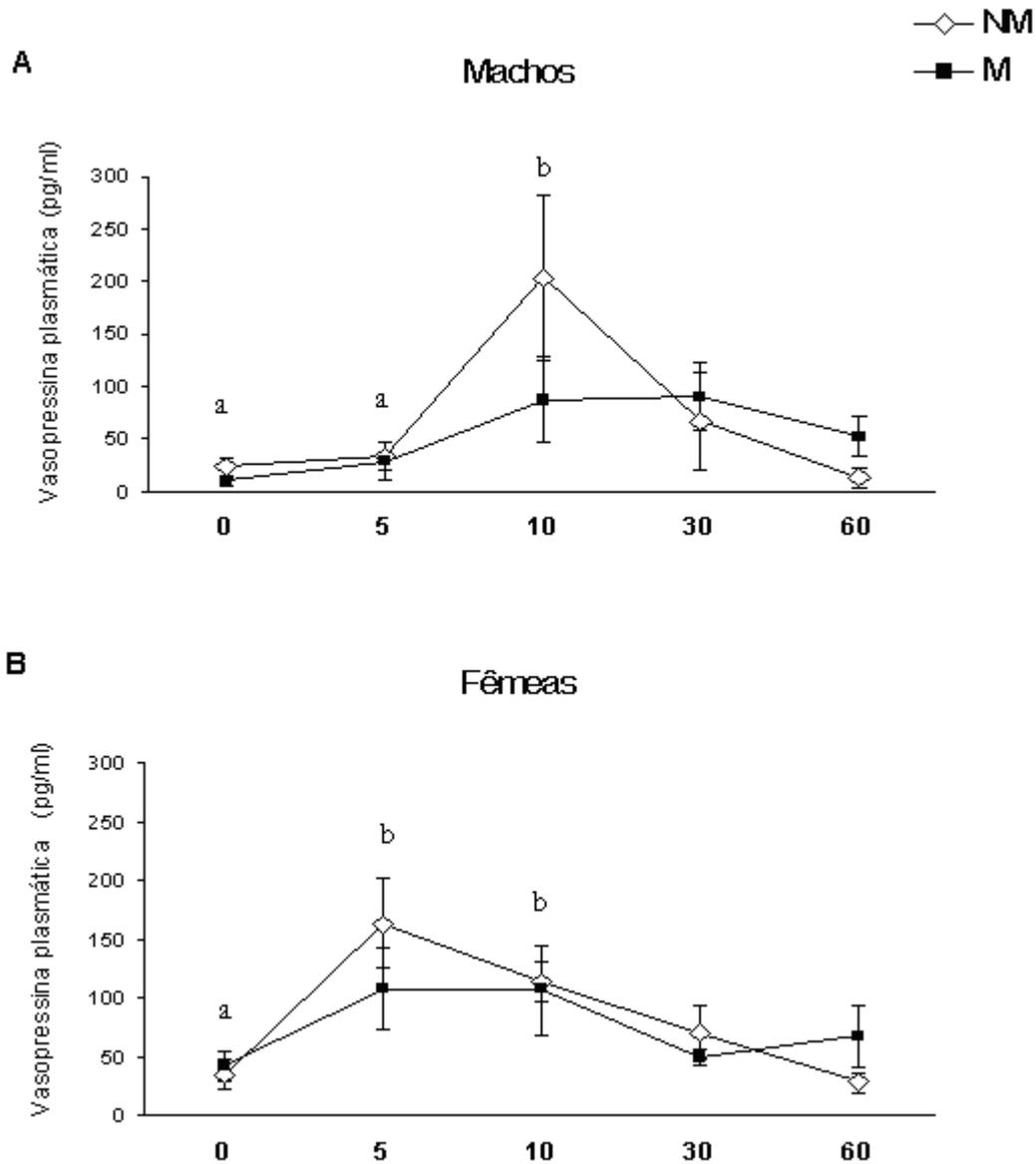


Figura 20. Concentração plasmática de VP em ratos adultos conscientes, machos (A) e fêmeas em diestro II (B), submetidos ao estresse por contenção. 0=basal; 5, 5 minutos após o início da contenção, 10, aos 10 min; 30, aos 30 min; 60, aos 60 min. Os ratos manipulados (M) foram submetidos à manipulação por 1 min/dia do primeiro ao décimo dias pós-natal ou não-manipulados (NM), não foram tocados no período pós-natal. a-b  $p < 0,05$  comparando-se as sessões. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA, seguido de *Newman-Keuls*.

### **Experimento 3 – Avaliação dos neurônios produtores de vasopressina nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo em ratos adultos manipulados no período neonatal.**

As figuras 21, 22 e 23 mostram o número de neurônios magnocelulares e parvocelulares imunorreativos à VP no PVN por secção de cérebro, em machos adultos. A ANOVA de uma via para medidas repetidas mostrou efeito significativo grupo [ $F(1,10)=25,96443$ ;  $p=0,00004$ ] e lado [ $F(1,10)=6,89$ ;  $p=0,02$ ]. Entretanto, para as células parvocelulares no PVN a análise não apresentou diferença significativa tanto em grupo [ $F(1,10)=0,04$ ;  $p=0,82$ ] como para lado [ $F(1,10)=0,52$ ;  $p=0,48$ ]. Na análise do número de neurônios imunorreativos à VP no SON não houve diferenças significativas, sem efeito grupo [ $F(1,10)=0,34$ ;  $p=0,57$ ] nem lado [ $F(1,10)=0,09$ ;  $p=0,76$ ] ou interação [ $F(1,10)=2,05$ ;  $p=0,18$ ].

As figuras 24, 25 e 26 representam, respectivamente, os neurônios magnocelulares e parvocelulares no PVN e os neurônios no SON de ratas em diestro II. Os neurônios magnocelulares não apresentaram efeito grupo [ $F(1,10)=3,06$ ;  $p=0,11$ ], efeito lado [ $F(1,10)=1,2$ ;  $p=0,29$ ], nem interação [ $F(1,10)=0,05$ ;  $p=0,82$ ]. O número de neurônios parvocelulares no PVN não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre as ratas manipuladas e as não-manipuladas [ $F(1,10)=0,005$ ;  $p=0,94$ ], também não houve efeito lado [ $F(1,10)=0,31$ ;  $p=0,58$ ] e nem interação [ $F(1,10)=0,52$ ;  $p=0,48$ ]. A ANOVA também não mostrou efeito no número de neurônios no SON [ $F(1,10)=0,0003$ ;  $p=0,98$ ] nem para lado [ $F(1,10)=0,13$ ;  $p=0,71$ ] ou interação [ $F(1,10)=0,45$ ;  $p=0,51$ ].

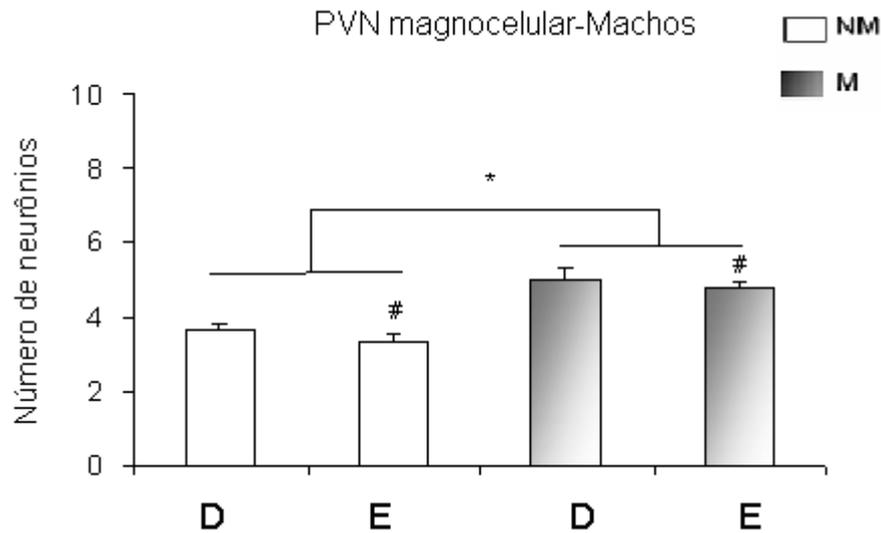


Figura 21. Número de células magnocelulares imunorreativas à VP por secção de cérebro, no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos adultos (machos), manipulados (M) e não-manipulados (NM) no período neonatal. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via, hemisfério como medida repetida, seguido de *Newman-Keuls*. Para grupo \* $p < 0,05$  quando comparado aos grupos não-manipulado e manipulados. Para hemisfério #  $p < 0,05$  quando comparados os lados direito e esquerdo.  $n = 6$  para ambos os grupos.

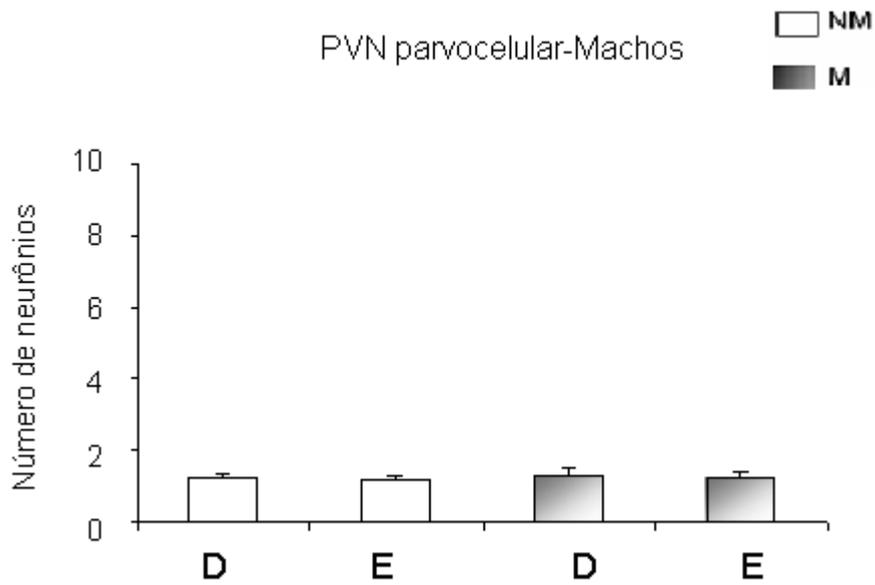


Figura 22. Número de células parvocelulares imunorreativas à VP por secção de cérebro, no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos adultos (machos) manipulados (M) e não-manipulados (NM) no período neonatal. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via, hemisfério como medida repetida, seguido de *Newman-Keuls*.  $n = 6$  para ambos os grupos.

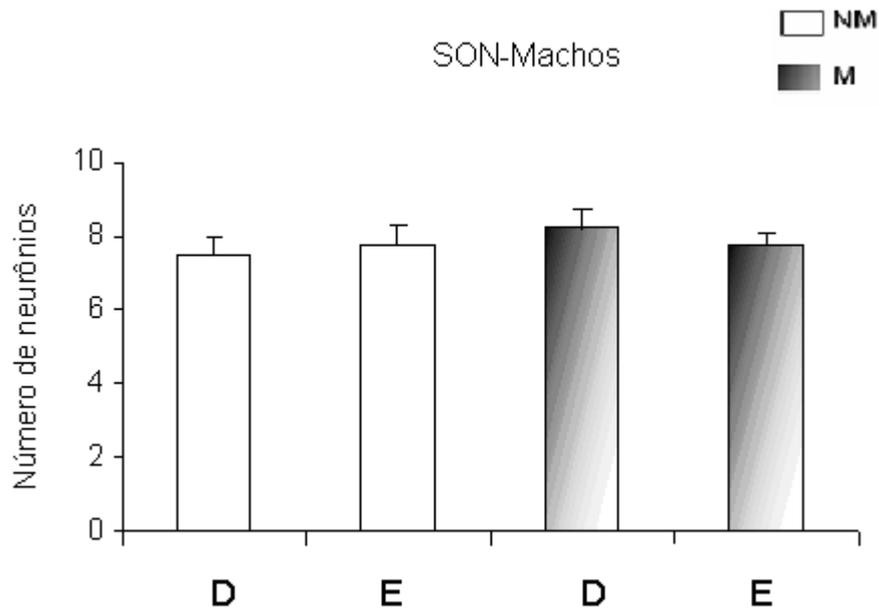


Figura 23. Número de células imunorreativas à VP por secção de cérebro, no núcleo supraóptico do hipotálamo de ratos adultos (machos) manipulados (M) e não-manipulados (NM) no período neonatal. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via, hemisfério como medida repetida, seguido de *Newman-Keuls*.  $n = 6$  para ambos os grupos.

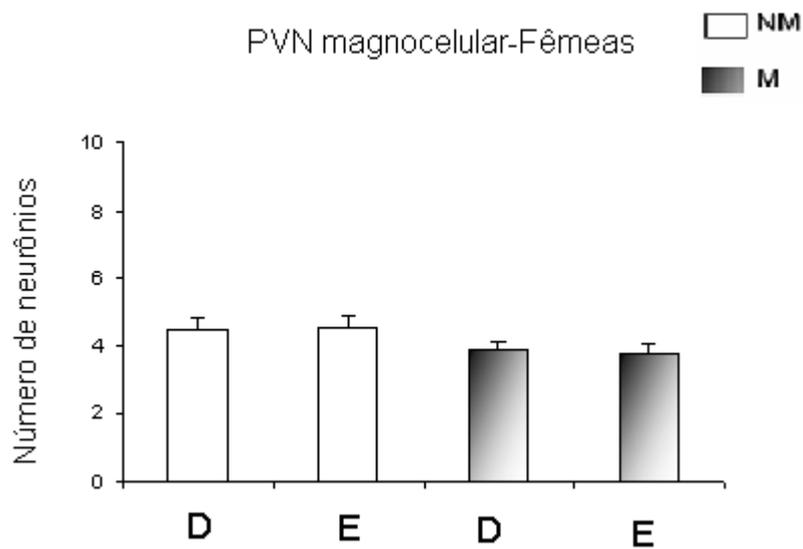


Figura 24. Número de células magnocelulares imunorreativas à VP por secção de cérebro, no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratas adultas (fêmeas) manipuladas (M) e não-manipuladas (NM) no período neonatal. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via, hemisfério como medida repetida, seguido de *Newman-Keuls*.  $n = 6$  para ambos os grupos.

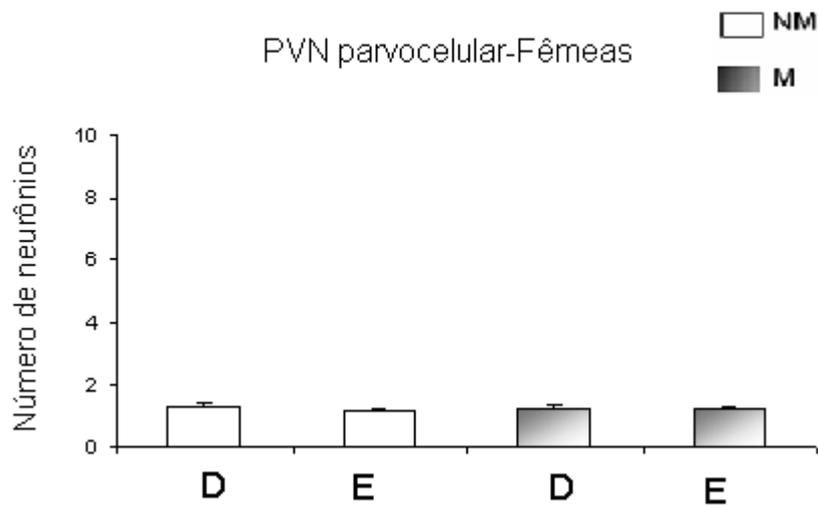


Figura 25. Número de células parvocelulares imunorreativas à VP por secção de cérebro, no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratas adultas, manipuladas (M) e não-manipuladas (NM) no período neonatal. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via, hemisfério como medida repetida, seguido de *Newman-Keuls*.  $n = 6$  para ambos os grupos.

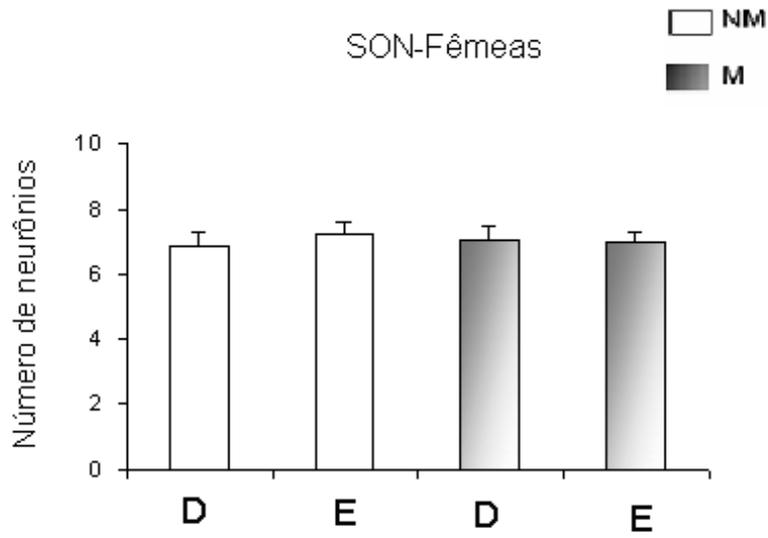


Figura 26. Número de células imunorreativas à VP por secção de cérebro, no núcleo supraóptico do hipotálamo de ratas adultas (fêmeas) manipuladas (M) e não-manipuladas (NM) no período neonatal. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  EPM e analisados utilizando ANOVA de uma via, hemisfério como medida repetida, seguido de *Newman-Keuls*.  $n = 6$  para ambos os grupos.

#### **Experimento 4 - Análise da quantidade de VP no PVN pelo método Western blotting, em ratos manipulados**

A figura 27 mostram o conteúdo de VP no PVN de ratos dos grupos não-manipulado e manipulado, machos, e fêmeas em diestro.

Para o conteúdo de VP no PVN, não foi observado efeito significativo entre os grupos. Em machos (fig. 27A), o teste t não mostrou diferenças [ $t(5)=2,008$ ,  $p=0,10$ ], que também não foram constatadas nas fêmeas (fig. 27B) [ $t(4)=0,81$ ,  $p=0,46$ ].

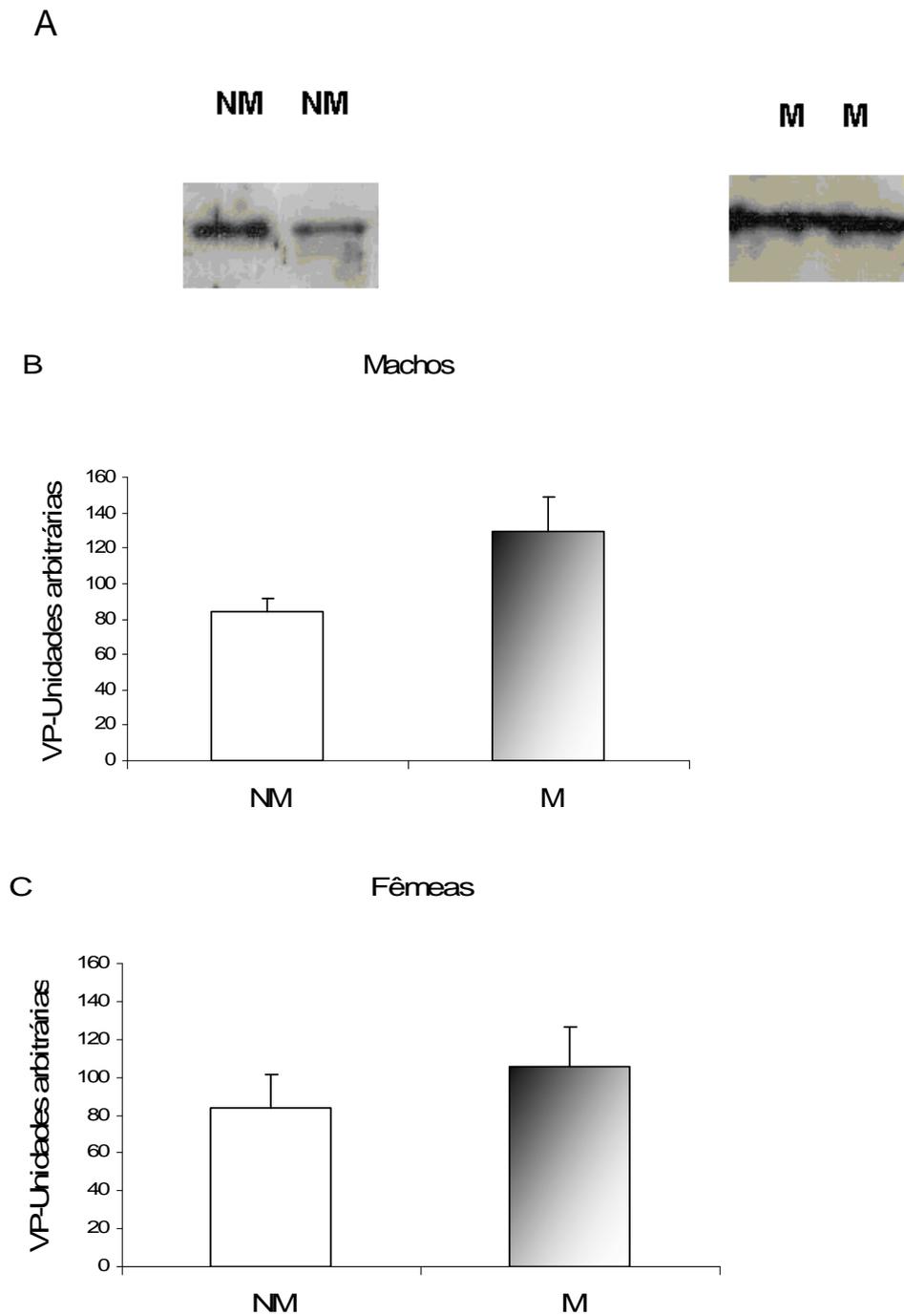


Figura 27. Expressão de vasopressina (VP) no núcleo paraventricular de ratos adultos, manipulados (M) e não-manipulados (NM), obtida pela densidade óptica de VP detectada por *western blot*. Machos (**B**) e fêmeas em diestro II (**C**). Em (**A**), figura representativa dos *western blots* para VP. Os dados foram expressos pela média ( $\pm$  EPM) e analisados utilizando teste t de Student. n=3-4 por grupo.

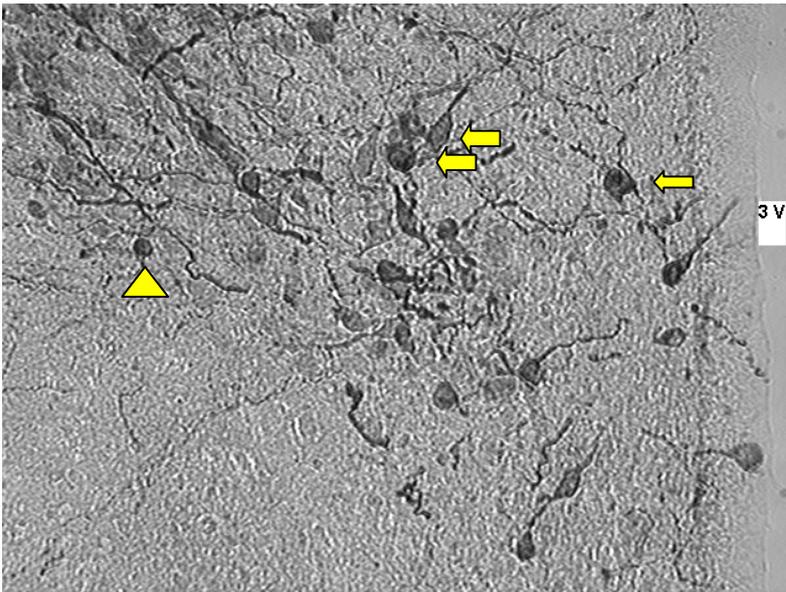


Figura 28. Foto em menor aumento (20X), demonstrando neurônios imunorreativos a VP, no PVN. Esta foto refere-se um rato macho não-manipulado. 3V, terceiro ventrículo; setas, neurônios magnocelulares; triângulo, parvocelulares.

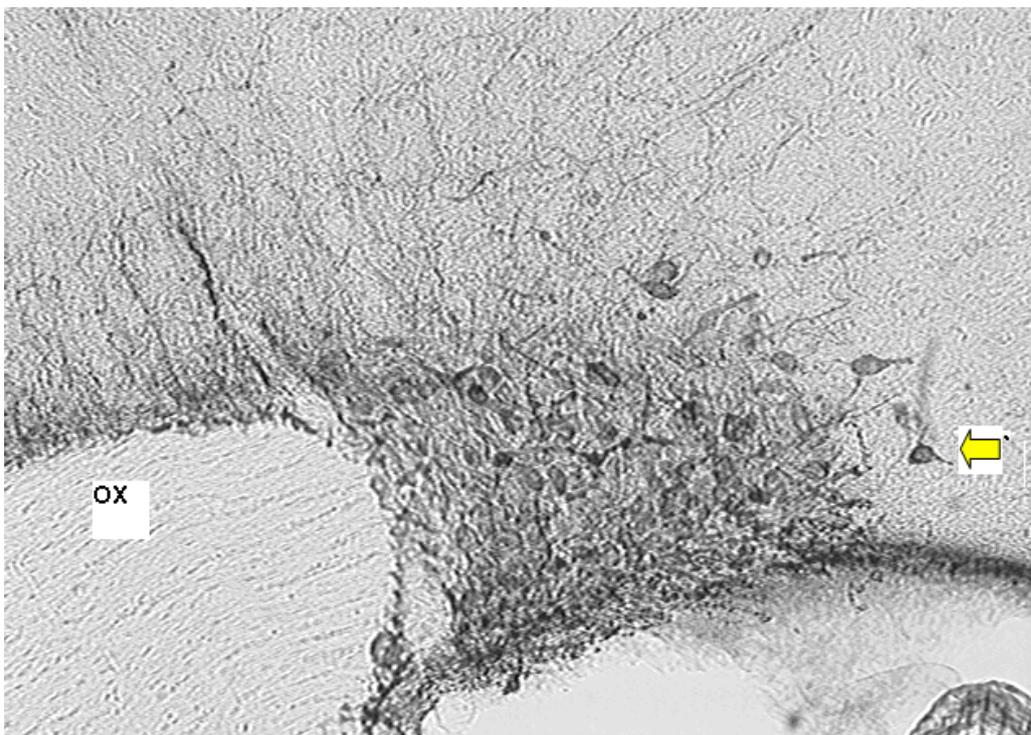


Figura 29. Foto em menor aumento (20X), a flecha indica um neurônio imunorreativo à VP, no SON. Esta foto refere-se a um rato macho não-manipulado. OX: quiasma óptico.

## DISCUSSÃO

A manipulação dos filhotes é um evento considerado estresse leve, que envolve uma breve separação seguido do aumento do comportamento maternal. Após este procedimento, a mãe responde aumentando o comportamento de lambar os filhotes, cujo SNC responde por sua vez, ativando populações neuronais em resposta ao aumento de estímulos obtidos pela mãe (Fenoglio et al, 2006, Cameron et al, 2008). Estudos em animais e humanos sugerem que o estresse na infância tem efeitos profundos na cognição e emocionalidade (Fenoglio et al, 2006). Os efeitos da manipulação podem ser observados já desde o período neonatal. Podem ocorrer alterações na plasticidade neuronal e hormonais em áreas relacionadas ao estresse e a reprodução. Demonstrou-se diminuição do número de neurônios, como o Locus coeruleus, já no décimo dia de vida (Lucion et al, 2001). No nono dia de vida, após o procedimento de manipulação, há aumento na expressão de Fos em regiões envolvidas com a resposta ao estresse que são regulatórias no PVN, induzindo a uma diminuição da expressão do mRNA para CRH no PVN (Fenoglio et al, 2004, Fenoglio et al, 2006).

Em ratos, o sistema hipotálamo neuro-hipofiseal (HNN) não está maduro até o sétimo dia de vida (Choy et al, 1980), entretanto após este período a VP responde com um aumento no plasma após o estresse hiperosmótico (Sinding et al, 1980). No presente trabalho não foi possível detectar alterações nos níveis plasmáticos de VP em filhotes, aos 10 dias de idade, não-manipulados e submetidos à manipulação única e à manipulação repetida, tanto em machos como em fêmeas, sugerindo que apesar do sistema HNN estar maduro, a manipulação não foi estímulo suficiente para aumentar sua liberação. O aumento do comportamento maternal induzido pela manipulação neonatal aos filhotes, aos 5 e 10 minutos após a devolução ao ninho induziu a uma tendência ao aumento da liberação plasmática da VP.

Vários estudos demonstraram que os neurônios vasopressinérgicos são suscetíveis a interferências durante o período de formação do sistema nervoso central, no período pré-natal e pós-natal, estas interferências podem induzir a mudanças na expressão do peptídeo e na sua liberação, tanto centralmente como periféricamente (Veenema et al, 2006, 2007, Desbonnet et al, 2008).

A liberação plasmática de VP pode ser um bom parâmetro para avaliar a atividade neuronal dos núcleos paraventricular e supraóptico, preferencialmente dos neurônios

magnocelulares (Ruscio et al, 2007). Neste trabalho, avaliamos o efeito do estresse sobre a liberação deste peptídeo. Apesar de haver um efeito do estresse na liberação, não foi observado um efeito da manipulação tanto em machos como em fêmeas, na vida adulta. Ruscio et al (2007) também detectaram alterações na imunorreatividade da VP no PVN e no SON sem observar alterações na liberação plasmáticas em fêmeas de roedores submetidos ao isolamento social. Apesar de ter sido observado em fêmeas, este resultado é interessante, pois devido ao aumento do número de neurônios magnocelulares poderíamos esperar como consequência um aumento da liberação periférica após o estresse nos animais manipulados. Entretanto, como a VP responde a vários tipos diferentes de estresse, o modelo de contenção pode não ter sido o mais adequado para testar a atividade neuronal, neste caso.

Por outro lado, estudos em roedores sugerem que níveis elevados centrais de VP estão relacionados ao aumento da agressividade (Veenema et al, 2006, 2007). Nossos resultados mostraram uma tendência ao aumento da agressividade em machos adultos manipulados, bem como um aumento no número de neurônios magnocelulares imunorreativos à VP. Considerando-se que o aumento do número de neurônios poderia expressar maior produção de VP, pode-se relacionar a agressividade dos machos manipulados a esse aumento. Ratos que sofreram separação maternal, após expostos ao teste de agressividade, tem um aumento na expressão de RNAm para VP no SON e PVN, bem como maior imunorreatividade à VP nos mesmos núcleos em comparação com ratos controle (Veneema et al, 2006). Camundongos adultos que sofreram separação maternal também tiveram um aumento da expressão de VP, na vida adulta, observada pelo aumento da imunorreatividade e na expressão da VP, que foi relacionada ao aumento na agressividade destes animais (Veneema et al, 2007). Por outro lado, ratos que sofreram separação maternal na infância apresentaram redução na imunorreatividade à VP, no PVN. Desde que a separação maternal no início da vida não pode ser comparada à manipulação neonatal por induzir a efeitos diferentes em animais adultos, por exemplo, aumento dos níveis de ACTH e corticosterona, o oposto ocorre em animais manipulados. Entretanto alguns mecanismos desencadeados por estes dois tipos de eventos estressores parecem agir da mesma maneira no sistema hipotalâmico vasopressinérgico em machos. Também foi relatado aumento da expressão de RNAm para VP no PVN em ratos adultos selecionados com alta ansiedade e cujas mães foram submetidas ao estresse durante a gestação, entretanto no SON os níveis mantiveram-se inalterados (Bosch et al, 2006).

Apesar de observarmos que houve um aumento no número de neurônios magnocelulares vasopressinérgicos em ratos adultos submetidos à manipulação neonatal, não

foi demonstrado diferenças no número de neurônios parvocelulares, que permaneceram estáveis.

Conjuntamente com o CRH, a VP é considerada um indutor da atividade do eixo HPA, agindo nos corticotrofos estimulando a liberação de ACTH. Dessa forma, a máxima ativação do eixo HPA requer a ação dos dois peptídeos. A VP originada dos neurônios parvocelulares é secretada na EM e age nos corticotrofos induzindo a liberação de ACTH via receptor V3 (Dinan & Scott, 2005). Sabe-se que eventos que alteram o ambiente neonatal afetam o eixo HPA e animais manipulados possuem menor expressão de CRH desde filhotes (Fenoglio et al, 2006) e menor número de células positivas para CRH quando adultos (Plotsky & Meaney, 1993), sendo assim, provavelmente a inibição do eixo HPA causada pela manipulação neonatal não se deve a alterações nas células vasopressinérgicas, visto que não foi demonstrado neste trabalho alterações no número das parvocelulares.

Ao contrário do estudo feito nos neurônios ocitocinérgicos, onde a manipulação induziu alterações tanto em machos como em fêmeas, a comparação entre o número de células nos grupos estudados, induzidos pela manipulação apresentou diferenças entre os sexos, as fêmeas manipuladas não apresentaram diferenças no número de neurônios magnocelulares VP positivos. A expressão dos comportamentos podem diferir entre os sexos, observou-se diferenças entre a quantidade de fibras vasopressinérgicas entre machos e fêmeas no SNC, machos apresentam maior quantidade destas fibras. Fêmeas tratadas com testosterona elevaram a quantidade destas fibras na mesma região, mostrando que a VP pode ser regulada pelos androgênios, além disso constatou-se receptores para estradiol tipo  $\beta$  nos neurônios magnocelulares VP-positivos, indicando que o estrogênio pode agir nos neurônios VP em fêmeas (Alves et al, 1998, Caldwell et al, 2008).

A VP está relacionada a várias funções no SNC. A depressão pode estar relacionada a um desequilíbrio no eixo HPA e alguns trabalhos apontam o papel da VP nesta patologia, visto que alguns experimentos demonstraram em humanos com depressão uma hipersensibilidade do receptor V3 e um aumento no número de neurônios vasopressinérgicos (Purba et al, 1996, Scott & Dinan, 1998, Dinan e Scott, 2005). Abusos na infância podem aumentar a vulnerabilidade a desordens emocionais, como depressão e ansiedade (Surget et al, 2008). Neste sentido, os ratos manipulados, que apresentam diminuição da capacidade de interagir socialmente aliado ao possível aumento da atividade do sistema vasopressinérgico indicado pelo aumento do número de células, pode indicar um sinal depressivo induzido pelo estresse no período neonatal, mas este parâmetro deve ser avaliado mais detalhadamente.

Em humanos as desordens autistas, que levam a incapacidade de relacionamento social, e podem ser causadas por fatores epigenéticos e endócrinos em que são desconhecidos os mecanismos, modificam a estrutura do SNC, possuem maiores níveis de VP. O autismo afeta mais o sexo masculino e pode estar relacionada com a alteração da produção de VP (Carter, 2007).

Este trabalho observou que há uma lateralização no hemisfério direito, onde se encontram maior número de neurônios VP-positivos, magnocelulares. Esta lateralização foi observada nos ratos não-manipulados e manteve-se com a manipulação neonatal. Assimetria é comum e encontrada no SNC, em várias regiões, entre elas no hipotálamo, e sugere a lateralização de funções (Para revisão, Harris et al, 1996). Entretanto, a lateralização não foi observada nas células parvocelulares, neste estudo.

Os níveis levemente maiores de VP expressos no PVN e a diminuição da capacidade de interação social em ratos adultos machos, descritos neste trabalho podem estar relacionados a desordens de sociabilidade. A manipulação induziu resultados distintos entre machos e fêmeas que confirmam as diferenças sexuais que os níveis deste peptídeo apresentam nos mamíferos (Carter, 2007). Estes resultados pedem uma avaliação mais detalhada entre as funções dos neurônios magnocelulares e parvocelulares do PVN, visto que há uma dissociação da resposta destes dois sistemas e do papel que a VP possui nos comportamentos sociais, estudados em roedores.

Em resumo, os neuropeptídeos liberados em regiões distintas do cérebro em resposta a estímulos, tanto estressantes como fisiológicos contribuem para as adaptações comportamentais e neuroendócrinas de um indivíduo que foi submetido ao estímulo. Somando-se a isso, os neuropeptídeos como a VP e OT apresentam diversas formas de liberação, incluindo a liberação somatodendrítica, que pode ocorrer separadamente da liberação axonal demonstra a complexidade deste sistema (Neumann, 2007).

## Conclusões

O capítulo referente ao sistema vasopressinérgico e manipulação neonatal apresentou resultados referentes à liberação plasmática de VP em duas idades (10 dias e adultos) e na comparação entre o número de neurônios imunorreativos à VP entre os grupos, bem como avaliou o conteúdo de VP no PVN. Observou-se um aumento no número de neurônios magnocelulares no PVN em machos adultos, sendo que não foi observado diferenças nas parvocelulares. Em estudo recentemente publicado (Winkelmann-Duarte et al, 2007) não houve constatação de diferenças no número total de células magnocelulares no PVN, entretanto o mesmo estudo demonstrou que há uma diminuição nas células parvocelulares, causadas pela manipulação neonatal. Não foram observadas diferenças na quantidade de neurônios no SON. Também não foi houve diferenças entre os grupos na liberação plasmática de VP aos 10 dias e após o estresse em ratos adultos, nem na quantidade de VP no PVN. Esperava-se que o aumento no número de neurônios magnocelulares VP imunorreativos nos machos adultos estivesse relacionado ao aumento da liberação de VP plasmática após o estresse, mas não foi possível detectar esse resultado utilizando-se este método.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos nesse estudo nos permitem concluir:

A manipulação neonatal repetida interfere com o comportamento social em machos adultos, reduzindo o comportamento de cheirar e investigar. Os animais manipulados apresentam menor motivação social para interagir com indivíduos da mesma espécie, e quando interagem fazem de forma negativa, indicado pelo aumento da agressividade. Entretanto, não há alterações no desempenho da memória social nestes animais. Esse efeito da manipulação neonatal é dependente de sexo, pois nos dois testes utilizados apenas os machos foram afetados.

O número de neurônios parvocelulares ocitocinérgicos, responsáveis pela produção e envio de OT a áreas extrahipotalâmicas, encontra-se diminuído em machos e fêmeas, considerando-se que se houver menor quantidade de neurônios terão como consequência menor produção, podendo ser considerado um dos coadjuvantes causadores do prejuízo do comportamento social nos machos. Entretanto, as fêmeas não apresentaram resultados indicativos de prejuízo nos comportamentos sociais.

Quanto à OT proveniente dos neurônios magnocelulares, que são responsáveis pela secreção pós-estresse deste hormônio não foi alterada pela manipulação, sendo portanto a provável causa da ausência de efeito na resposta deste ao estresse em machos, apesar de observar-se um atraso no padrão de liberação nas fêmeas.

A produção de OT em filhotes machos e fêmeas aos 10 dias após o nascimento foi alterada pela manipulação repetida, a manipulação foi um potente indutor do aumento da liberação plasmática de OT após este procedimento, indicando que desde o período neonatal este sistema é responsivo à manipulação.

A manipulação neonatal repetida aumenta a quantidade de neurônios magnocelulares vasopressinérgicos, em machos e fêmeas, embora não tenha sido demonstrado alterações na liberação plasmática pós-estresse tanto em filhotes como em adultos. Entretanto não pudemos relacionar o aumento da VP ao aumento da agressividade nestes animais.

Assim, a influência da manipulação neonatal sobre o comportamento social não pode ser explicada totalmente pela quantidade de OT ou VP produzida no SNC os efeitos de longa duração da manipulação, porque neste trabalho observou-se alterações somente em machos.

Mais estudos podem ser necessários para podermos correlacionar os comportamentos apresentados pelos animais manipulados com a produção e a liberação de OT e VP.

## REFERÊNCIAS

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADER, R. Effects of early experiences on emotional and physiological reactivity in the rat. *Journal of Comparative Physiology Psychology* (2):264-8. 1968.
- ALVES S E., LOPEZ V, MCEWEN BS., WEILAND NG. Differential colocalization of estrogen receptor b (ERb) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraoptic nuclei of the female rat brain: An immunocytochemical study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3281–3286. 1998.
- AMICO J.A., MANTELLA R.C., VOLLMER R.R., LI X. Anxiety and stress responses in female oxytocin deficient mice. *Journal of Neuroendocrinology* 16:319-324. 2004.
- ANISMAN, H., ZAHARIA, M.D., MEANEY, M.J., MERALI, Z. Do early life permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *International Journal of Developmental Neuroscience* 16:149-164. 1998.
- APFELBACH R, BLANCHARD C D., BLANCHARD R. J, HAYESD R. A., MCGREGOR I.S. The effects of predator odors in mammalian prey species:A review of field and laboratory studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29: 1123–1144. 2005.
- BALE, TL., DAVIS AM, AUGER AP, DORSA DM, MCCARTHY MM. CNS Region-Specific Oxytocin Receptor Expression: Importance in Regulation of Anxiety and Sex Behavior. *The Journal of Neuroscience* 21(7):2546–2552. 2001.
- BEN-BARAK Y, JAMES F, RUSSELL T., WHITNALL M.H., OZATO K, GAINER H. Neurophysin in the hypothalamic-neurohypophysial system I. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies. *The Journal of Neuroscience* 5: 81-97. 1985.
- BIELSKY I.F., YOUNG LJ. Oxytocin, vasopressin and social recognition in mammals. *Peptides* 25(9): 156-174. 2004.

- BREDY TW, GRANT RJ, CHAMPAGNE DL, MEANEY MJ. Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. *Eur J Neurosci*. 18(10):2903-9. 2003.
- BREDY TW, LEE AW, MEANEY MJ, BROWN RE. Effect of neonatal handling and paternal care on offspring cognitive development in the monogamous California mouse (*Peromyscus californicus*). *Hormones and Behavior* 46(1):30-8. 2004.
- BOSCH O J., KROMER S A., NEUMANN I. D. Prenatal stress: opposite effects on anxiety and hypothalamic expression of vasopressin and corticotropin-releasing hormone in rats selectively bred for high and low anxiety. *European Journal of Neuroscience* 23:541–551, 2006.
- CARRASCO GA, VAN DE KAR LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol*. 463(1-3):235-72. 2003.
- CARTER C.S. The chemistry of child neglect: Do oxytocin and vasopressin mediate the effects of early experience? *PNAS* 102 : 18247–18248. 2005.
- CARTER CS. Sex differences in oxytocin and vasopressin: Implications for autism spectrum disorders? *Behavioural Brain Research* 176: 170–186. 2006.
- CARTER C.S., KEVERNE E. B. “The Neurobiology of Social Affiliation and Pair Bonding.” Pp. 299–337 in *Hormones, Brain, and Behavior*. Ed. by Pfaff, D. V. I. NY: Academic Press. 2002.
- CARTER C.S. Oxytocin and sexual behavior. *Neurosci Biobehav Rev*.16(2):131-44. 1992.
- CARTER D.A., SARIDAKI E., LIGHTMAN S.L. Sexual differentiation of oxytocin stress responsiveness: effect of neonatal androgenization, castration and a luteinizing hormone-releasing-hormone antagonist. *Acta Endocrinol (Copenh)* 117:525-530.1988.
- CALDJI C, FRANCIS DD, SHARMA S, PLOTSKY PM, MEANEY MJ. The effects of early rearing environment on the development of GABA<sub>A</sub> and central benzodiazepine receptor

- levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology* 22(3):219-29. 2000.
- CALDWELL J.D. Central oxytocin and female sexual behavior. *Annals NY Acad. Sciences* 652:166-79. 1992.
- CALDWELL H K., HEON-JIN LEE, MACBETH A H., YOUNG W. III . Vasopressin: Behavioral roles of an “original” neuropeptide. *Progress in Neurobiology* 84: 1–24. 2008.
- CALIGIONI CS, FRANCI CR. Oxytocin secretion induced by osmotic stimulation in rats during the estrous cycle and after ovariectomy and hormone replacement therapy. *Life Sciences* 71(24):2821-31. 2002.
- CALIGIONI CS, OLIVER C, JAMUR MC, FRANCI CR. Presence of oxytocin receptors in the gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurones in female rats: a possible direct action of oxytocin on GnRH neurones. *J Neuroendocrinol* 19(6):439-48. 2007.
- CHOLERIS, E., KAVALIER, M., PFAFF, W. Functional genomics of social recognition. *Journal of Neuroendocrinology* 16:383-389. 2004.
- CHOY V.J., WATKINS W.B. Maturation of the hypothalamic-neurohypophysial system. I. Localization of neurophysin, oxytocin and vasopressin in the hypothalamus and neural lobe of the developing rat brain. *Cell Tissue Res* 197(2):325-36.1974.
- CUNNINGHAM. J.T., PENNY M L., MURPHY D. Cardiovascular regulation of supraoptic neurons in the rat: synaptic inputs and cellular signals. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 84: 183–196. 2004.
- CUNNINGHAM, E.T. SAWCHENKO, P.E. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *Trends in Neuroscience* 14(9): 406-411. 1991.
- DEBIEC, J. From affiliative behaviors to romantic feelings: A role of nanopeptides. *FEBS Letters* 581: 2580–2586. 2007.

DENENBERG, V.H. Critical periods, stimulus input and emotional reactivity: a theory of infantile stimulation. *Psychological Review* 51: 335-351. 1964.

DESBONNET L., GARRETT L., DALY E., MCDERMOTT K.W., DINAN T.G. Sexually dimorphic effects of maternal separation stress on corticotrophin-releasing factor and vasopressin systems in the adult rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 26, 259–268. 2008.

DE WIED D, DIAMANT M., FODOR M. Central nervous system effects of the neurohypophyseal hormones and related peptides. *Frontiers Neuroendocrinology* 14(4):251-302. 1993.

DINAN T.G., SCOTT L. V. Anatomy of melancholia: focus on hypothalamic– pituitary– adrenal axis overactivity and the role of vasopressin. *J. Anat.* 207: 259–264. .2005.

ENGELMANN, M.; WOTJAK, C.T.; EBNER, K.; LANDGRAF, R. Behavioural impact of intraseptally released vasopressin and oxytocin in rats. *Experimental Physiology* 85 Spec No:125S-130S. 2000.

ENGELMANN M, EBNER K., LANDGRAF R., WOTJAK C.T. Effects of Morris water maze testing on the neuroendocrine stress response and intrahypothalamic release of vasopressin and oxytocin in the rat. *Hormones and Behavior* 50: 496–501. 2006.

ENGELMANN M, LANDGRAF R. Microdialysis administration of vasopressin into the septum improves social recognition in Brattleboro rats. *Physiology and Behavior* 55:145-149.

FENOGLIO K, BRUNSON KL., BARAM TZ.. Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: Functional and molecular aspects. *Frontiers in Neuroendocrinology* 27: 180–192. 2006 a.

FENOGLIO KA., YUNCAI CHEN, BARAM TZ.. Neuroplasticity of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis Early in Life Requires Recurrent Recruitment of Stress-Regulating Brain Regions. *The Journal of Neuroscience* 26(9):2434–2442. 2006 b.

FERGUSON J. N., YOUNG L.J., INSEL T.R. the neuroendocrine basis of social recognition *Frontiers in neuroendocrinology* 23:200-224. 2002.

FILE SE, HYDE JR. Can social interaction be used to measure anxiety? *Br. J Pharmacol* 62: 19-24.1978.

FRIES AB, ZIEGLER TE, KURIAN JR, JACORIS S, POLLAK SD. Early experience in humans is associated with changes in neuropeptides critical for regulating social behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.*102(47):17237-40. 2005.

FRYE C.A., RHODES ME. Infusions of 3,5-THP to the VTA enhance exploratory, anti-anxiety, social, and sexual behavior and increase levels of 3,5-THP in midbrain, hippocampus, diencephalon, and cortex of female rats. *Behavioural Brain Research* 187: 88–99. 2008.

FRANCIS, DD, MEANEY, MJ. Maternal care and the development of stress responses. *Current opinion in Neurobiology* 9:128-134. 1999.

FRANCIS, DD, CHAMPAGNE F.C., MEANEY, MJ. Variations in maternal behavior are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *Journal of Neuroendocrinology* 12: 1145-1148. 2000.

GERENDAI I, HALASZ B. Asymmetry of the neuroendocrine system. *News Physiol Sci.* 16:92-5. 2001.

GILMORE J.H., LIN W., PRASTAWA M.W., LOONEY C.B., VETSA Y.S.K., KNICKMEYER R.C., EVANS D.D., SMITH J.K., HAMER R.M., LIEBERMAN J.A., GERIG G. Regional Gray Matter Growth, Sexual Dimorphism, and Cerebral Asymmetry in the Neonatal Brain. *The Journal of Neuroscience* 27(6):1255–1260 . 2007.

- GIMPL G.; FARENHOLZ F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological Review* 81(2): 629-83. 2001.
- GOMES CM, FRANTZ PJ, SANVITTO GL, ANSELMO-FRANCI JA, LUCION AB. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Braz J Med Biol Res.* 32(10):1239-42. 1999.
- GOMES CM, RAINEKI C, RAMOS DE PAULA P, SEVERINO GS, HELENA CV, ANSELMO-FRANCI JA, FRANCI CR, SANVITTO GL, LUCION AB. Neonatal handling and reproductive function in female rats. *J Endocrinol.* 184(2):435-45. 2005.
- GREER, ER, CALDWELL JD, JOHNSON MF., PRANGE AJ., JR., PEDERSEN, CA. Variations in concentration of oxytocin and vasopressin in the Paraventricular nucleus of the hypothalamus during the estrous cycle in rats. *Life Sciences* 38: 2311-2318. 1986.
- HARRIS J.A., GUGLIELMOTTI V., BENTIVOGLIO M. Diencephalic Asymmetries *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 20:637-6431. 1996.
- HESS, J.; DENENBERG, V.H., ZARROW, M.X. & PFEIFER, W.D. Modification of the corticosterone response curve as a function of handling in infancy. *Physiology and Behavior* 4: 109-111. 1969.
- HOMBERG JR, SCHIEPERSO J, SCHOFFELMEER AN, CUPPEN E, VANDERSHUREN LJ. Acute and constitutive increases in central serotonin levels reduce social play behaviour in peri-adolescent rats. *Psychopharmacology (Berl).* 195(2):175-82. 2007.
- JEZOVA D, SKULTETYOVA I, TOKAREV DI, BAKOS P, VIGAS M Vasopressin and oxytocin in stress. *Ann N Y Acad Sci.* 771:192-203.1995.
- JOHNSON B A, LEON M. Chemotopic Odorant Coding in a Mammalian Olfactory System. *J Comp Neurol.* 503(1): 1-34. 2007.

- KAFFMAN A, MEANEY M.J. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 48:3/4: 224–244. 2007.
- KEPECS A, UCHIDA N, MAINEN ZF. The Sniff as a Unit of Olfactory Processing. *Chem. Senses* 31: 167–179. 2006.
- KISS, J.Z., MARTOS, J., PALKOVITS, M. Hypothalamic paraventricular nucleus: a quantitative analysis of cytoarchitectonic subdivision in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*. 1991.
- KISS A., MIKKELSEN, J.D. Oxytocin– Anatomy and functional assignments: a minireview. *Endocrine Regulation* 39: 97-105. 2005.
- KEVERNE E.B. Importance of olfactory and vomeronasal systems for male sexual function. *Physiology & Behavior* 83: 177-187. 2004.
- KOSTEN, TA, KARANIAN DA, YEH J, HAILE CN, KIM JJ, KEHOE P, BAHR BA. Memory impairments and hippocampal modifications in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Neurobiol Learn Mem.* 88(2):167-76. 2007.
- KOSTEN T.A., MISERENDINO M.J.D., BOMBACE J.C., LEE H.J., KIM J.J. Sex-selective effects of neonatal isolation on fear conditioning and foot shock sensitivity. *Behavioural Brain Research* 157: 235–244. 2005.
- LAGUNA-ABREU MTC, KOENIGKAM-SANTOS M., COLLETA A.M.D., ELIAS P.C.L., MOREIRA A.C., ANTUNES-RODRIGUES J., ELIAS L.L., CASTRO M. Time course of vasopressin and oxytocin secretion after stress in adrenalectomized rats. *Hormones Metabolism Research* 37:84-88. 2005.
- LANG RE, HEIL JWE, GANTEN D, HERMANN K, UNGER T, RASCHER W. Oxytocin unlike vasopressin is a stress hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 37: 314-316.1983.

- LEE R., BRADY D L., SHAPIRO R A., DORSA D M., KOENIG J I. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Research*. 2007.
- LEVINE S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology & Behavior* 73: 255-260.2001.
- LEVINE R., HALTMEYER G.C., KARAS G.G., DENENBERG V.H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiology and Behavior* 2: 55-59. 1967.
- LIM M.M, YOUNG L.J. Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. *Hormones and Behavior*. 50:506-517. 2006.
- LIU D, DIORIO J, DAY JC, FRANCIS DD, MEANEY MJ. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci*. 3(8):799-806. 2000.
- LUDWIG M., LENG G. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nat Rev Neurosci*.7(2):126-36. 2006.
- LUBIN DA, ELLIOT JC, BLACK MC, JOHNS JM. An oxytocin antagonist into the central nucleus of amígdala increases maternal aggressive behavior. *Behavioral Neuroscience* 117: 195-200. 2003.
- LUCION AB, PEREIRA FM, WINKELMAN EC, SANVITTO GL, ANSELMO-FRANCI JA. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behav Neurosci*.117(5):894-903. 2003.
- MADEIRA M.D., SOUSA A, CADETE-LEITE N., LIEBERMAN A.R., PAULA-BARBOSA M.M. . The supraoptic nucleus of the adult rat hypothalamus displays marked sexual dimorphism which is dependent on body weight. *Neuroscience* 52: 497-513. 1993.
- MANDARIM-DE-LACERDA CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Ciênc*. 75(4):469-86. 2003.

MEANEY, M.J.; SEEMA, B.; LAROCQUE, S.; MCCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V., PLOTSKY, P.M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. *Annals of New York Academy of Sciences* 697: 70-85. 1993.

MEANEY, M.J, SZYF M, SECKL J R. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *TRENDS in Molecular Medicine* Vol.13 No.7. 2007.

MEERLO, P.; HORVATH, K.M.; NAGY, G.M.; BOHUS, B. & KOOLHAAS, J.M. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *Journal of Neuroendocrinology* 11: 925-933. 1999.

MIRANDA-CARDENAS, Y; ROJAS-PILONI, G.; MARTINEZ-LORENZANA G., RODRIGUEZ-JIMENEZ J.LOPEZ-HIDALGO M.FREUND-MERCIER MJ, CONDESLARA M. Oxytocin and electrical stimulation of the paraventricular hypothalamic nucleus produce antinociceptive effects that are reversed by an oxytocin antagonist. *Pain* 122 (1-2):182-9. 2006.

MODAHL C., GREEN, L.A., FEIN D., MORRISM., WATERHOUSE L., FEINSTEIN C., LEVIN H. Plasma oxytocin levels in autistic children. *Biol Psychiatry* 43:270-277. 1998.  
this morning,

MORRIS, M.; CALLAHAN, M.F.; LI, P.; LUCION, A.B. Central oxytocin mediates stress-induced tachycardia. *Journal of Neuroendocrinology* 7(6):455-9. 1995.

NEUMANN ID, TORNER L, WIGGER A. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behavior in virgin, pregnant and lactating rats. *Neuroscience* 95: 567-575. 2000.

NEUMANN ID. Involvement of the brain oxytocin system in stress coping: interactions with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Prog Brain Res.*;139:147-62. 2002.

- NEUMANN I.D. Stimuli and consequences of dendritic release of oxytocin within the brain. *Biochemical Society Transactions* Vol 35, part 5. 2007.
- NOONAN LR, CALDWELL J.D, LIL., WALKER C.H., PEDERSEN CA, MASON GA. Neonatal stress transiently alters the development of hippocampal oxytocin receptors. *Developmental Brain Research* 80: 115-120. 1994.
- NUMAN M. Maternal behavior. In: *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd, new York. Pgs. 1569-1645. 1988.
- OLIET S.H.R., PIET R. Anatomical Remodelling of supraoptic nucleus changes in synaptic and extrasynaptic transmission. *Journal of Neuroendocrinology* 16:303-307. 2004.
- ONAKA O. Neural pathways controlling central and peripheral oxytocin release during stress. *Journal of Neuroendocrinology* 16:208-312. 2004.
- PAPPAIOANNOU A., DAFNI U., ALIKARIDIS F., BOLARIS S. STYLIANOPOULOU F. Effects of neonatal handling on basal and stress-induced monoamine levels in the male and female rat brain. *Neuroscience* 114:195-206. 2002.
- PADOIN M.J.; CADORE L.P.; GOMES C.M.; BARROS H.T.M., LUCION A.B. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behavioral Neuroscience* 115 (6): 1332-1340. 2001.
- PALKOVITS. M. Microdissection of brain nuclei. In *maps and guide to microdissection of the rat brain*. Pg. 3-15. Palkovits M & Brownstein M. Elsevier. 1988.
- PATIN V., LORDI B, VINCENT A., CASTON J.. Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. *Developmental Brain Research* 160: 265 – 274. 2005.
- PAXINOS G, WATSON C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press, 1997.

- PEDERSEN CA, BOCCIA ML. Oxytocin Maintains as Well as Initiates Female Sexual Behavior: Effects of a Highly Selective Oxytocin Antagonist. *Hormones and Behavior* 41:170–177. 2002.
- PEDERSEN CA, BOCCIA ML. Vasopressin interactions with oxytocin in the control of female sexual behavior. *Neuroscience* 139(3):843-851. 2006.
- PEDERSEN, C.A.; JOHNS, J.M., MUSIOL, I.; PEREZ-DELGADO, M.; AYERS, G.; FAGGIN, B.; CALDWELL, J.D. Interfering with somatosensory stimulation from pups sensitizes experienced, postpartum rat mothers to oxytocin antagonist inhibition of maternal behavior. *Behavioral Neuroscience* 109(5): 980-90. 1995.
- PEINADO, MA, PEROSA, JÁ, RODRIGO, J. *Avances in inmunocitoquímica y técnicas relacionadas*. Jaen: Universidad. 1996.
- PETERSEN M B. The Effect of Vasopressin and Related Compounds at V1a and V2 Receptors in Animal Models Relevant to Human Disease. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 99: 96–103. 2006.
- PRYCE C.R., BETTSCHER D., FELDON J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Developmental Psychobiology* 38:239-251. 2004.
- PURBA J.S., HOOGENDIJK W.J., HOFMAN M.A., SWAAB D.F. Increased number of vasopressin and oxytocin-expressing neurons in paraventricular nucleus of hypothalamus in depression. *Archives of Gen Psychiat* 56(2): 137-143. 1996.
- RINAMAN L. Visceral sensory inputs to the endocrine hypothalamus. *Frontiers in Neuroendocrinology* 28: 50–60. 2007.
- RUSCIO MG, SWEENEY T., HAZELTON J, SUPPATEKUL P, CARTER C.S. Social environment regulates corticotropin releasing factor, corticosterone and vasopressin in juvenile prairie voles. *Hormones and Behavior* 51: 54–61. 2007.

- SABATIER N.  $\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone and Oxytocin: A Peptide Signalling Cascade in the Hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology* 18, 703–710. 2006.
- SAMSON W.K. The posterior pituitary and water metabolism. In: *Textbook of Endocrine Physiology*. Griffin, J. E.; Ojeda, S. R. Oxford University Press, New York, 1996.
- SANCHEZ-ANDRADE G, JAMES BM, KENDRICK KM. Neural encoding of olfactory recognition memory. *Journal of Reproduction and Development*, 51: 547-558. 2005.
- SCANTAMBURLO G., HANSENNEB M, FUCHSA S., PITCHOT W., MARECHAL P., PEQUEUX C., ANSSEAU M., LEGROS J.J. Plasma oxytocin levels and anxiety in patients with major depression. *Psychoneuroendocrinology* 32, 407–410. 2007.
- SEVERINO G.S.; FOSSATI I.A.; PADOIN M.J.; GOMES C.M.; TREVIZAN L.; SANVITTO G.L.; FRANCI C.R.; ANSELMO-FRANCIJ.A. & LUCION A.B. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiology & Behavior* 81: 489-98. 2004.
- SINDING C, SEIF SM, ROBINSON AG. Levels of neurohypophyseal peptides in the rat during the first month of life. I Basal levels in plasma, pituitary, and hypothalamus. *Endocrinology* 107:749-754.1980a.
- SINDING C, ROBINSON AG, SEIF SM. Levels of neurohypophyseal peptides in the rat during the first month of life. II Response to physiological stimuli. *Endocrinology* 107:755-759.1980b.
- SINDING C., ROBINSON AG, SEIF SM, SCHMID PG. Neurohypophyseal peptides in the developing rat fetus. *Brain Research* 195:177-186. 1980c.
- STRATAKI, C.A., CHROUSOS G.P. Neuroendocrine and pathophysiology of the stress system. *Annals NY Acad Sci* 771:1-18. 1995.

- SULLIVAN RM, DUFRESNE MM. Mesocortical dopamine and HPA axis regulation: role of laterality and early environment. *Brain Research*. 1076(1):49-59. 2006.
- SWAIN. J. E., LORBERBAUM J P., KOSE S., STRATHEARN L. Brain basis of early parent–infant interactions: psychology, physiology, and in vivo functional neuroimaging studies. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 48:3/4 :262–287. 2007.
- SWANSON, L.W. SAWSHENKO, P.E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annals Review Neuroscience* 6: 269-324. 1983.
- TANG AC, REEB BC, ROMEO RD, MCEWEN BS. Modification of social memory, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and brain asymmetry by neonatal novelty exposure. *J Neurosci*. 23(23):8254-60. 2003.
- TILBROOK A.J., CLARKE I.J. Neuroendocrine mechanisms of innate states of attenuated responsiveness of the hypothalamo-pituitary adrenal axis to stress. *Frontiers in Neuroendocrinology* 27 285–307. 2006.
- TRESCHAN TA, PETERS J. The vasopressin system: physiology and clinical strategies. *Anesthesiology*. 105(3):599-612. 2006.
- TRIBOLLET E., BARBERIS C., DUBOIS-DAUPHIN M., DREIFUSS J.J. Localization and characterization of binding sites for vasopressin and oxytocin in the brain of the guinea pig. *Brain Research* 589(1):15-23. 1992.
- THOMPSON M.R., CALLAGHAN P.D., HUNT G.E., CORNISH J.L., MCGREGOR I.S. A role for oxytocin and 5-HT1A receptors in the prosocial effects of 3,4 METHYLENEDIOXYMETHAMPHETAMINE (ECSTASY). *Neuroscience* 146: 509-514. 2007.
- URIARTE N., BREIGEIRON MK, BENETTI F, ROSA XF., LUCION AB. Effects of Maternal Care on the Development, Emotionality, and Reproductive Functions in Male and Female Rats. *Developmental Psychobiology* 49: 451-462. 2007.

- UGRUMOV M.V. Differentiation of Magnocellular Vasopressinergic Neurons and Its Regulation by Signal Molecules in Ontogenesis. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 38: 575-585. 2002.
- UVNAS-MOBERG K. Oxytocin mediate the benefits of positive social interactions and emotion. *Psychoneuroendocrinology* 23: 819-835. 1998.
- VARLINSKAYA E.I., SPEAR L.P. Social interactions in adolescent and adult Sprague-dawley male rats: Impact of social deprivation and test context familiarity. *Behavioral Brain Research* 188:398-405. 2008.
- VEENEMA AH, BLUME A, NIEDERLE D, BUWALDA B, NEUMANN ID. Effects of early life stress on adult male aggression and hypothalamic vasopressin and serotonin. *Eur J Neurosci.* 24(6):1711-20. 2006.
- VEENEMA AH., BREDEWOLD R, NEUMANN ID. Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: Link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology* 32: 437–450. 2007.
- WALLNER B, DITTAMI J, MACHATSCHKE I. Social stimuli cause changes of plasma oxytocin and behavior in guinea pigs. *Biol Res* 39(2):251-8. 2006.
- WINSLOW J.T., CAMACHO F. Cholinergic modulation of a decrement in social investigation following repeated contacts between mice. *Psychopharmacology (Berl).* 121(2):164-72. 1995.
- WOTJAK C T., NARUO T, MURAOKA S, SIMCHEN R, LANDGRAF R, ENGELMANN M. Forced swimming stimulates the expression of vasopressin and oxytocin in magnocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *European Journal of Neuroscience* 13: 2273-2281. 2001.
- WOTJAK C.T., GANSTER J., KOHL G., HOLSBOER F., LANDGRAF R., ENGELMANN M. Dissociated Central and peripheral release of vasopressin, but not

oxytocin, in response to repeated swim stress: New insight into the secretory capacities of peptidergic neurons. *Neuroscience* 85:1209-1222. 1998.

WEAVER ICG, CERVONI N, CHAMPAGNE FA, D'ALESSIO AC, SHARMA S, SECKL JR, DYMOV S, SZYF M, MEANEY MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience* 7: 847-854. 2004.

ZEKI, S. The neurobiology of love. *FEBS Letters* 581: 2575–2579. 2007.

ZINGG H.H., LAPORTE S.A. The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab* 14(5).222-227. 2003.

ANEXOS

**Anexo 1**

Parte dos resultados desta pesquisa foram publicados. Os resultados referentes ao número de neurônios imunorreativos à OT em fêmeas estão em um artigo que foi publicado na revista Brain Research, em 2007.

**Anexo 2**

Os resultados referentes a manipulação neonatal e seus efeitos nos sistemas ocitocinérgico e vasopressinérgico e em comportamentos sociais, em machos e fêmeas estão em um artigo publicado na revista Hormones & Behavior.

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)**BRAIN  
RESEARCH****Research Report****Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats**

Elisa C. Winkelmann-Duarte<sup>a,b</sup>, Anelise S. Todeschin<sup>a</sup>, Marilda C. Fernandes<sup>c</sup>,  
 Lisandra C. Bittencourt<sup>a</sup>, Gabriela A.M. Pereira<sup>d</sup>, Vinicius N. Samios<sup>a</sup>, Artur F.S. Schuh<sup>a</sup>,  
 Matilde E. Achaval<sup>e</sup>, Leder L. Xavier<sup>f</sup>, Gilberto L. Sanvitto<sup>a</sup>,  
 Carlos A. Mandarim-de-Lacerda<sup>g</sup>, Aldo B. Lucion<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Pesquisa em Patologia, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Biologia, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil

<sup>e</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>f</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>g</sup>Laboratório de Morfometria e Morfologia Cardiovascular, Centro Biomédico, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 12 July 2007

Available online 20 July 2007

## Keywords:

Stress

Oxytocin

Plasticity

Development

Paraventricular nucleus

Supraoptic nucleus

## ABSTRACT

Early-life events can exert profound long-lasting effects on several behaviors such as fear/anxiety, sexual activity, stress responses and reproductive functions. Present study aimed to examine the effects of neonatal handling on the volume and number of cells in the hypothalamic paraventricular nucleus (pPVN, parvocellular and mPVN, magnocellular regions) and the supraoptic nucleus (SON) in female rats at 11 and 90 days of age. Moreover, in the same areas, immunohistochemistry for oxytocin (OT) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) were analyzed in the adult animals. Daily handling during the first 10 postnatal days reduced the number of cells in the pPVN and SON at both the 11 and 90 days. Handling decreased the number of OT-positive parvocellular cells in the PVN in adult females. No significant differences were detected on the optical density (OD) of GFAP-positive cells between the handled and nonhandled adult females. The effect of handling on cell loss was observed 24 h after the 10-day handling period and persisted into adulthood, indicating a stable morphological trace. Results suggest that neonatal handling can induce plastic changes in the central nervous system.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**1. Introduction**

The disruption of the mother–infant relationship constitutes the bases for the vulnerability to diseases like depression (Heim et al., 1997; Nemeroff, 2004). In rat pups, brief separation

from the mother associated with repeated handling, usually during the first two postnatal weeks, is seemingly an innocuous intervention. However, these early-life events can exert profound long-lasting effects on several behaviors such as fear/anxiety (Madruga et al., 2006; Padoin et al., 2001; Tejedor-Real et al., 1998);

\* Corresponding author. Fax: +55 51 33083656.

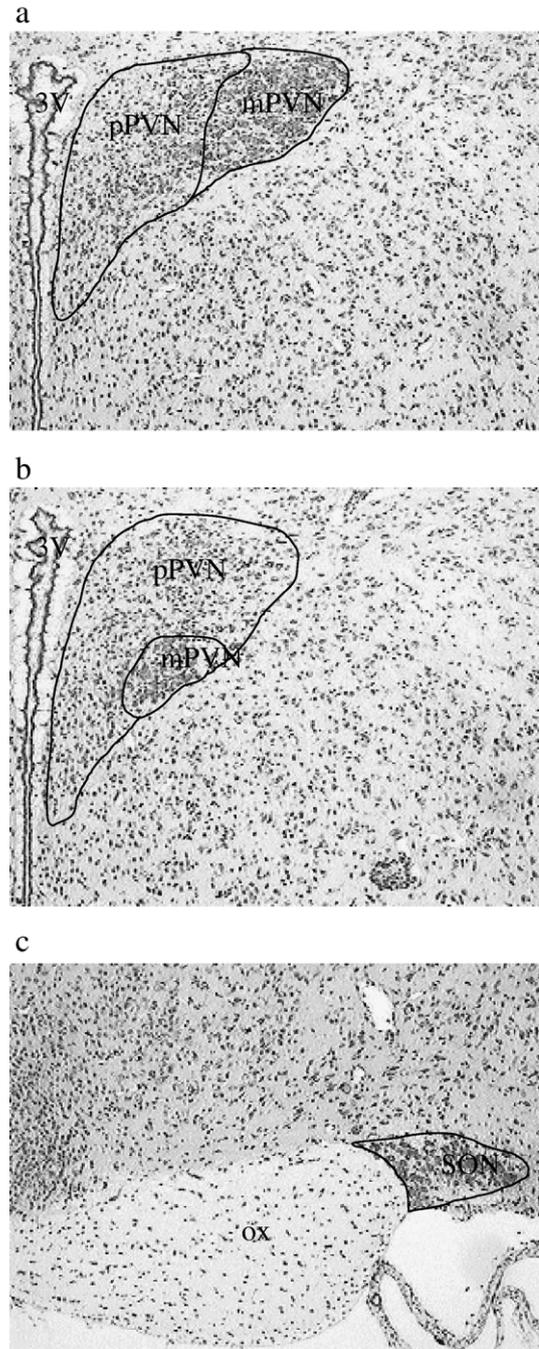
E-mail address: [alucion@ufrgs.br](mailto:alucion@ufrgs.br) (A.B. Lucion).

male and female sexual activity (Padoin et al., 2001); as well as stress responses (Caldji et al., 1998; Meerlo et al., 1999; Pryce et al., 2001; Severino et al., 2004), reproductive functions (Gomes et al., 1999, 2005; Mazaro and Lamano-Carvalho, 2006) and regulation of the fluid balance [data not published]. Besides the behavioral and neuroendocrine effects, neonatal handling may also induce stable structural alterations in the central nervous system. Indeed, it is related to an increased density of glucocorticoid receptors in the hippocampus and frontal cortex (Liu et al., 1997; Meaney et al., 1996) and changes in hippocampal GABA<sub>A</sub> receptors (Hsu et al., 2003). On the other hand, daily handling of the rats can reverse the reduction in the volume of the hippocampus induced by the neonatal hypoxia/ischemia (Rodrigues et al., 2004). Previous study (Lucion et al., 2003) showed that daily neonatal handling during the first 10 postnatal days results in a reduction of the number of cells in the locus coeruleus (LC) of male and female rats at several ages (11, 27, 36 and 90 days old), presenting evidence for a stable and long-lasting structural change. An important demonstration of experience-induced neuroplasticity during the neonatal period (Fenoglio et al., 2006) shows that repeated handling, but not a single manipulation event, evokes Fos expression in the thalamic paraventricular nucleus, a stress-related structure.

Although the behavioral and neuroendocrine effects of neonatal handling have been extensively described, the neurological changes have been less focused, specifically in females. Previous studies have shown that, in females, the neonatal handling procedure can induce reproductive changes, control of ovulation for instance, that have been related to neuroendocrine functions regulated by the hypothalamus (Gomes et al., 2005). The purpose of the present study was to examine the effects of neonatal handling on the number of cells and the volume of the hypothalamic paraventricular nucleus (magnocellular, mPVN and parvocellular, pPVN regions) and the supraoptic nucleus (SON) in female rats at 11 and 90 days of age. These nuclei have been chosen due to their participation in functions that are altered by the handling procedure, such as reproduction, stress response and fluid balance. The number of oxytocin (OT)-positive cells was used as a more specific marker for neurons in the PVN and SON. Moreover, this hormone exerts modulatory actions on reproductive functions in females, as well as on behaviors related to social interaction. Both outcomes may be altered by early-life interventions. Moreover, the density of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunostained cells was measured in order to evaluate a possible specific effect of neonatal handling on the glial cells. The hypothesized changes in the number of cells could be either generalized or restricted to one type of cell in the nuclei studied. We aimed to test the hypothesis that early-life stimulation may induce plastic changes in critical neural structures for the stress response, reproduction, and behaviors in female rats.

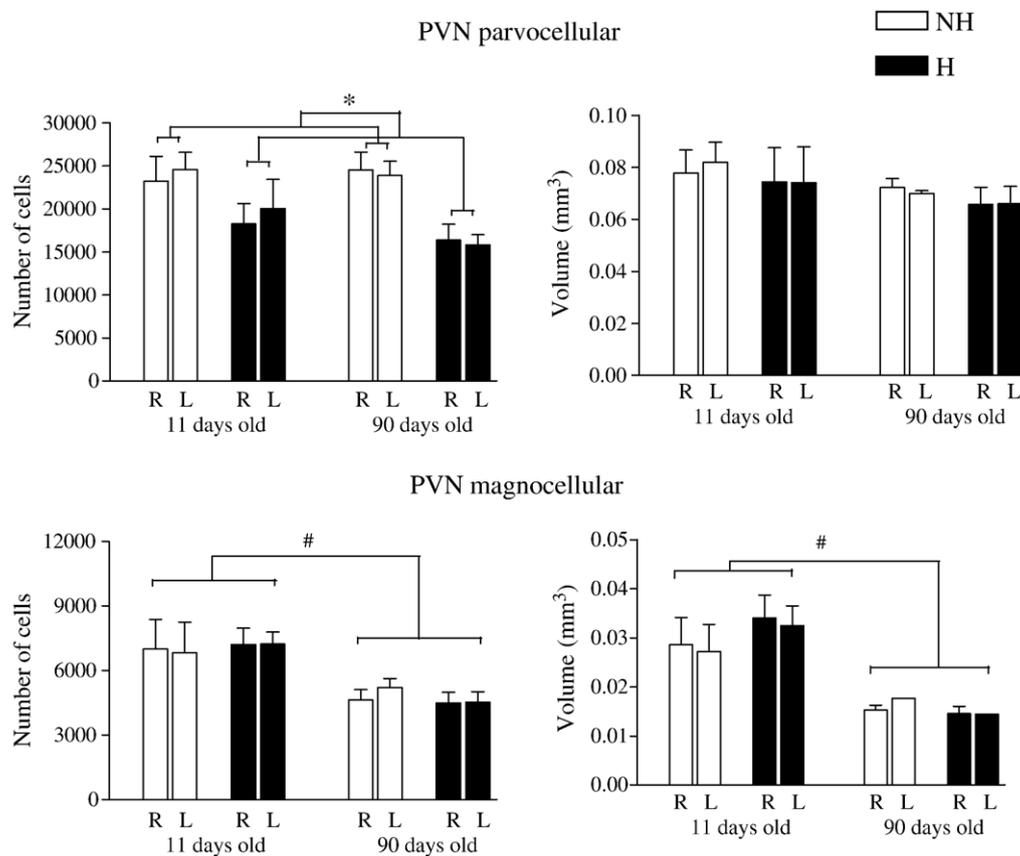
## 2. Results

Fig. 1 shows a representative low magnification view of the areas studied: pPVN, mPVN and SON. The tissue is from a nonhandled rat.



**Fig. 1** – Low magnification view (10 $\times$ ) and location of pPVN (a and b), mPVN (a and b) and SON (c) where cells were counted and the volume of the nuclei was analyzed in female rats. 3V—3rd ventricle; pPVN—parvocellular region of the PVN; mPVN—magnocellular region of the PVN; SON—supraoptic nucleus; ox—optic chiasm.

Fig. 2 shows the estimated total number of cells and the volume of the pPVN and mPVN. Significant main effect for group ( $F(1,20)=8.920$ ,  $p<0.01$ ) with a decreased number of cells in the pPVN of handled females compared with nonhandled ones was shown. No significant main effects for age ( $F(1,20)=0.402$ ) and side ( $F(1,20)=0.523$ ) were detected on the number of cells. No significant interaction was observed between group (nonhandled



**Fig. 2** – Effects of neonatal handling on the number of cells and volume of the right (R) and left (L) side parvocellular (pPVN) and magnocellular (mPVN) region of the PVN in female rats at 11 and 90 days of age. The estimated total number of cells and volume (mm<sup>3</sup>) is reported as mean  $\pm$  SEM. Nonhandled control rats were kept undisturbed during the neonatal period and handled animals were gently manipulated for 1 min daily from the 1st to the 10th day after delivery ( $n=6$  for all groups and ages). Results were compared between groups (nonhandled and handled), ages (11 and 90 days of age) and sides of the brain (right and left) by a two-way ANOVA. \*Indicates significant main effect for group. #Indicates significant main effect for age.

and handled), age (11 and 90 days) and side (right and left) ( $F(1,20)=0.016$ ). Fig. 2 also illustrates the estimated volume (mm<sup>3</sup>) of the pPVN in female rats. No significant main effects for group ( $F(1,20)=0.390$ ), age ( $F(1,20)=0.978$ ), side ( $F(1,20)=0.111$ ) and interaction between group (nonhandled and handled), age (11 and 90 days old) and side (right and left) ( $F(1,20)=2.334$ ) were detected.

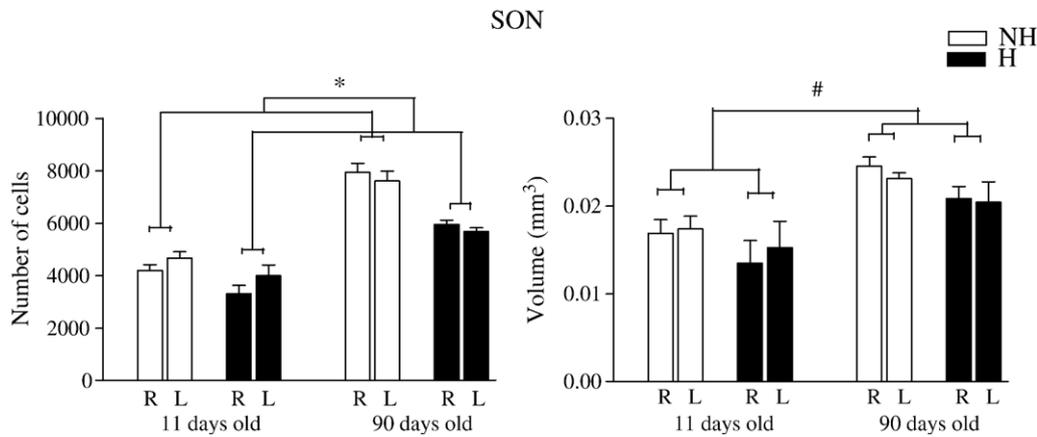
The estimated total number of cells and the volume of the mPVN are also illustrated in Fig. 2. ANOVA shows a significant main effect for age ( $F(1,20)=7.940$ ,  $p<0.01$ ) with a decreased number of cells in the mPVN in the 90-day-old females compared with 11-day-old females. No significant main effects for group ( $F(1,20)=0.005$ ), side ( $F(1,20)=0.562$ ) and interaction ( $F(1,20)=1.367$ ) were detected on the number of cells in the mPVN. Moreover, Fig. 2 shows no significant main effects for group ( $F(1,20)=0.216$ ) and side ( $F(1,20)=0.227$ ) in the volume of the mPVN. However, a significant main effect for age ( $F(1,20)=17.412$ ,  $p<0.001$ ) and interaction between the age and side ( $F(1,20)=12.640$ ,  $p<0.01$ ) were observed in the volume of the mPVN. Post hoc analysis revealed that the volume of the mPVN decreased in the 90-day-old female relative to the 11-day-old female (Newman-Keuls test,  $p<0.05$ ).

Fig. 3 illustrates the results of the estimated total number of cells and the volume of the SON. Significant main effects for group ( $F(1,20)=11.615$ ,  $p<0.01$ ) and age ( $F(1,20)=49.608$ ,

$p<0.001$ ) were detected in the number of cells in the SON. Handling reduced the number of cells and 90-day-old rats showed more cells than the 11-day-old ones. No significant main effect for side ( $F(1,20)=0.028$ ) and interaction between group, age and side ( $F(1,20)=1.894$ ) was observed. However, a significant interaction between age and side ( $F(1,20)=4.684$ ,  $p<0.05$ ) was detected. Newman-Keuls test shows that 90-day-old females have more cells than the 11-day-old pups in both sides of the brain, but no significant difference was detected between sides within the age groups.

Fig. 3 also shows a significant effect of age ( $F(1,20)=16.020$ ,  $p<0.001$ ) on the volume of SON, with an increased volume at the age of 90 days relative to 11 days. The main effect for the group almost reached significance ( $F(1,20)=3.633$ ,  $p=0.07$ ). No significant main effect for side ( $F(1,20)=0.197$ ) and no significant interaction between group, age and side ( $F(1,20)=0.155$ ) were detected in the volume of SON.

Table 1a illustrates the optical density of GFAP immunohistochemistry in the nuclei analyzed. No significant main effects for group ( $F(1,8)=0.025$ ), side ( $F(1,8)=0.121$ ) and interaction between group and side ( $F(1,8)=2.155$ ) were detected in the pPVN. Similar results were found in the mPVN with respect to the optical density of glial cells (main effects for group ( $F(1,8)=0.026$ ), side ( $F(1,8)=0.663$ ) and interaction between group and side ( $F(1,8)=0.049$ ).



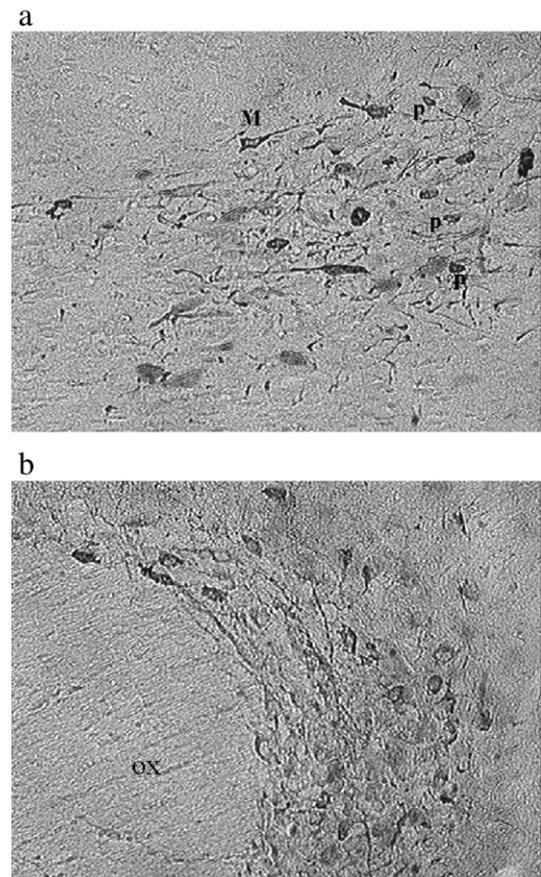
**Fig. 3 – Effects of neonatal handling on the number of cells and volume of the right and left side of the SON in female rats at 11 and 90 days of age. The same procedures as described in Fig. 2 were adopted. \*Indicates significant main effect for group. #Indicates significant main effect for age.**

Moreover, no significant main effect for group ( $F(1,8)=0.182$ ), side ( $F(1,8)=1.167$ ) and interaction between group and side ( $F(1,8)=0.337$ ) were observed in the density of glial cells in the SON.

Table 1b presents intracellular optical density of GFAP within the cytoplasm of glial cells in the pPVN, mPVN and SON. Results showed no significant main effects for group ( $F(1,8)=0.111$ ), side ( $F(1,8)=0.277$ ) and interaction between group and side ( $F(1,8)=0.006$ ) in the pPVN. No significant effects were detected in the mPVN (group  $F(1,8)=0.145$ , side  $F(1,8)=0.010$  and interaction between group and side  $F(1,8)=4.947$ ). Moreover, no significant main effects for group ( $F(1,8)=2.957$ ), side ( $F(1,8)=1.074$ ) and interaction between group and side ( $F(1,8)=0.318$ ) were shown in the GFAP density within cells in the SON.

Fig. 4 shows a representative low magnification view of the OT immunohistochemistry in the PVN and SON. Tissue is from an adult nonhandled female.

Fig. 5 shows the number of OT-positive parvocellular neurons (diameter of cell bodies less than  $12\ \mu\text{m}$ ) in 90-day-old females. One-way ANOVA showed significant main effect for group ( $F(1,10)=8.660$ ,  $p<0.05$ ) with a decreased number of

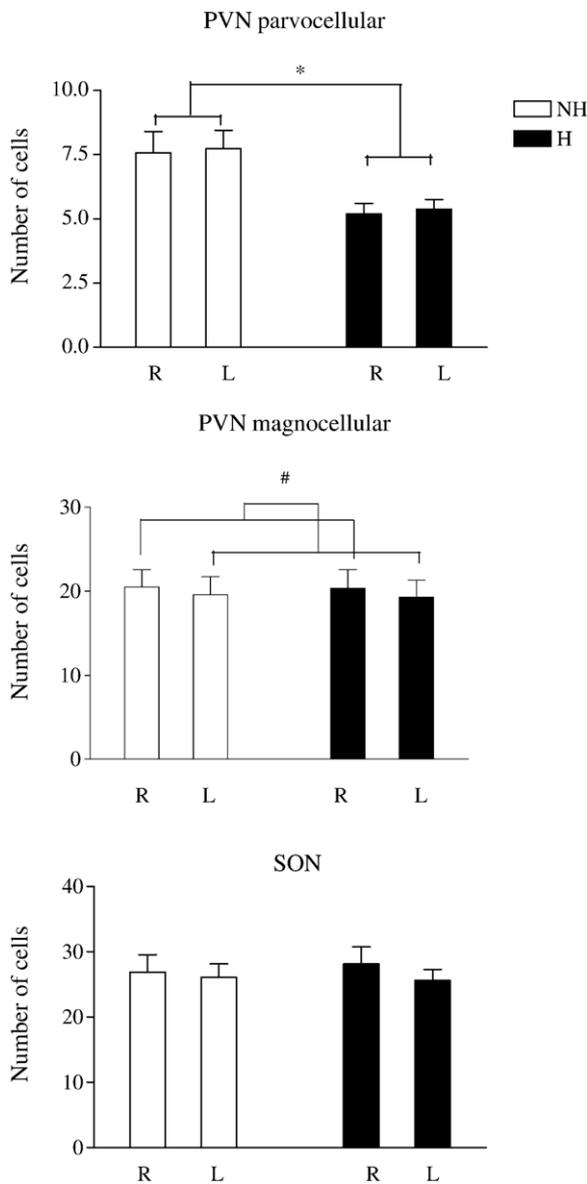


**Fig. 4 – Low magnification view (20x) of PVN (a) and SON (b) where positive OT-immunostained cells were counted in female rats. p—parvocellular immunostained neuron; M—magnocellular immunostained neuron of the PVN; ox—optic chiasm.**

**Table 1 – Effects of neonatal handling on regional (a) and intracellular (b) OD of GFAP in the pPVN, mPVN and SON of female rats at 90 days of age**

Nucleus	Group	OD right side	OD left side
<i>(a) Regional optical density (OD) of GFAP</i>			
pPVN	NH	33.8±1.8	32.9±1.6
	H	32.7±1.3	33.3±1.4
mPVN	NH	30.0±1.4	29.5±0.5
	H	30.0±1.1	29.2±0.5
SON	NH	47.2±2.3	45.2±1.4
	H	45.5±1.9	45.0±0.9
<i>(b) Intracellular optical density (OD) of GFAP</i>			
pPVN	NH	51.2±1.5	52.0±1.9
	H	51.6±1.3	52.2±1.1
mPVN	NH	50.3±2.0	47.5±1.1
	H	47.0±1.3	49.6±0.9
SON	NH	50.2±0.8	49.7±1.2
	H	49.3±1.0	47.6±1.0

The ODs are reported as mean ± SEM and compared between groups (nonhandled and handled) and sides of the brain (right and left) by a one-way ANOVA ( $n=5$  for all groups). No significant differences were detected.



**Fig. 5 – Effects of neonatal handling on the number of positive oxytocin-immunostained cells of the right (R) and left (L) side parvocellular (pPVN) and magnocellular (mPVN) regions of the PVN and right (R) and left (L) side of the SON in female rats at 90 days of age. The estimated average number of cells per brain section is reported as mean ± SEM. Nonhandled control rats were kept undisturbed during the neonatal period and handled animals were gently manipulated for 1 min daily from the 1st to the 10th day after delivery ( $n=6$  for all groups of animals). Results were compared between groups (nonhandled and handled) and sides of the brain (right and left) by a one-way ANOVA. \*Indicates significant main effect for group. #Indicates significant main effect for side.**

OT cells in the handled group. No significant main effect for side ( $F(1,10)=0.343$ ) and interaction ( $F(1,10)=0.003$ ) was detected. Fig. 5 also shows that the number of OT-positive magnocellular neurons (diameter of cell bodies more than  $12\ \mu\text{m}$ ) was not different between the groups ( $F(1,10)=0.005$ ). However, slightly more OT-positive cells were detected in the right side than in the

left ( $F(1,10)=5.479$ ,  $p<0.05$ ). No interaction group versus side was detected ( $F(1,10)=0.029$ ). Fig. 5 also presents the number of OT-positive neurons in the SON. One-way ANOVA showed no significant main effect for group ( $F(1,10)=0.017$ ), side ( $F(1,10)=1.179$ ) and interaction ( $F(1,10)=0.328$ ).

The mean ( $\pm$ SEM) body weight (g) of the 11-day and 90-day-old handled females ( $23.6\pm 1.2$  and  $232.1\pm 8.7$ , respectively) was not different from the nonhandled group ( $20.7\pm 1.2$  and  $223.5\pm 11.2$ ;  $t(10)=1.67$  and  $t(10)=0.61$ , respectively). The mean ( $\pm$ SEM) brain weight (g) of the 11-day-old handled ( $1.13\pm 0.03$ ) was significantly lower than the nonhandled at the same age ( $1.03\pm 0.02$ ;  $t(10)=2.66$ ). However, the brain weight (g) of the 90-day-old handled ( $1.76\pm 0.07$ ) group was not different from the nonhandled group at the same age ( $1.68\pm 0.03$ ;  $t(10)=0.91$ ).

### 3. Discussion

Handling during the first 10 days of life induced a stable reduction in the number of cells, as measured by the total estimated number of cells, in the parvocellular region of the PVN in both sides of the brain. Handled females at the age of 11 and 90 days showed fewer cells than nonhandled ones. The cell loss was detected shortly after the manipulation period. At 90 days of age, the number of cells was not significantly different from the 11 days in both groups, indicating that the major effect of handling probably occurred during the neonatal period. Furthermore, the decrease in the total number of cells was at least partially due to a reduction of the OT-producing parvocellular neurons in the PVN of adult females. However, surprisingly the volume of the pPVN did not change. Our initial hypothesis was that glial cells would be responsible for the maintenance of the nucleus volume. However, the density of GFAP was not different between the two groups. It is noteworthy that the density of GFAP is not a measurement of the number of glial cells. Moreover, it is possible that other factors, like the size and number of neuron prolongations, instead of an increase in glial cells, could be involved in the volume compensation.

Handling did not change the estimated total number and also OT-positive magnocellular neurons in the PVN. The volume of this region was not altered by the neonatal handling procedure. However, the estimated total number of cells and volume of the mPVN in both nonhandled and handled animals decreased throughout life. As in the parvocellular region, handling did not alter the OD of GFAP in the mPVN. The handling procedure affected the number of cells in the parvocellular region of the PVN, which expresses several neuromodulators, mainly CRH neurons, but not the magnocellular region that projects neurons to the posterior lobe of the pituitary.

In the SON, handling reduced the estimated total number of cells in the right and left side compared with nonhandled. However, no change was detected in OT-positive neurons. The reduction in the volume of the nucleus induced by handling was discrete. On the other hand, the total number of neurons in the control nonhandled females increased from the 11th to the 90th day, concurrently with an increase in the volume of the nucleus, which is in agreement with previous report (Crespo et al., 1990). Similarly, the estimated total number of cells

increased in the handled females. In the right side, the proliferation of cells of the SON from the neonatal period to adulthood was minimally affected by the handling procedure. On the left side, a different picture emerged; handled females increased 42%, while nonhandled ones increased 63%. A previous study (Tang and Reeb, 2004) also described a differential effect of handling on the two sides of the brain indicating that early-life stimulation may induce brain lateralization.

Although mPVN and SON synthesize OT and arginine vasopressin (AVP) and the majority of neurons project to the posterior pituitary, the neonatal environmental stimulation affected only the SON cells. An important difference between the two structures is the postnatal cell proliferation. While the number of magnocellular neurons in the mPVN is decreased when comparing the 90th with the 11th day of age, cells in the SON proliferate throughout life, especially in the right hemisphere. When considering the total number of cells harbored throughout life, the mPVN is more stable than the SON. It is possible that, at the time of handling stimulation, some SON cells were in the process of division and differentiation rendering them more likely to be affected by environmental stimuli relative to other quiescent cells at that time. It is interesting to note that a previous study (Lucion et al., 2003) showed a significant reduction in the number of cells in the LC in response to stimulation. Interestingly, the LC is also a nucleus in which the number of cells increases throughout life. We suggest that the capacity to proliferate could make the cells in the SON more susceptible to neonatal stimulation. However, handling also reduced the number of cells in the pPVN, a region in which the cell number did not increase when comparing the 11th and 90th day time points.

In order to explain the observed reduction in the number of cells, as early as 11 days postpartum, it is important to know whether the parvocellular neurons in the PVN and neurons in the SON respond to the handling procedure. Previous studies (Avishai-Eliner et al., 2001; Fenoglio et al., 2004, 2006) have shown that neonatal handling from day 1 postpartum decreases CRH mRNA expression in the PVN beginning on postpartum day 9 and extending through day 45. Thus, during the neonatal period, CRH neurons in the PVN do respond to environmental stimulation, including handling. It is not known whether the SON is activated. Nevertheless, by a yet unrevealed manner, the handling procedure reduced the estimated total number of cells in the pPVN and SON and the number of OT-positive parvocellular neurons in the PVN. The decreased number of cells is probably not related to a decrease in body weight. Differences in body weight between handling and nonhandling groups here reported did not reach statistical significance, however, in a previous study (Gonzalez et al., 1990), higher body weights were observed in the handled animals.

Considering that the infusion of an OT-receptor antagonist (OTA) into the PVN increases basal and stimulated secretion of ACTH in male and female rats (Neumann et al., 2000), the reduction in the number of OT cells in the PVN, here shown, would not be compatible with the phenotype of neonatal handled animals. However, OT is also well known for its effects on social bonding, sexual and reproductive behaviors in several species [Cushing and Carter et al., 2000, Wallner et al., 2006 and for a review, Young et al., 2005]. In female rats, intracerebroventricular infusion of OT-receptor antagonist reduces sexual

behavior (Pedersen and Boccia, 2002), and the infusion of OT prevented the decline of the behavior induced by AVP (Pedersen and Boccia, 2006). Thus, the reduction in the number of OT cells could be related to the decline in sexual receptiveness in female rats, as previously shown [Padoin et al., 2001 and for a review, Cameron et al., 2005]. Although the present study did not measure the functionality of OT system, we may predict that early-life intervention can reduce social interaction, such as sexual and maternal behavior, for instance. However, this assumption is based only on the decreased number of OT cells in the PVN. The outcomes of the neonatal handling procedure have been considered positive, such as the reduction in fear and stress response. These positive outcomes have been explained by the increased maternal behavior induced by the brief separation of the pups (Caldji et al., 2000; Liu et al., 1997). However, the reduction in reproductive functions in females casts doubts on the positive outcome of the handling procedure, and a more complex picture emerged.

The results of this study extend knowledge in this field but also raise intriguing questions, which will require additional studies to address. For instance, results show that the neonatal mother–infant disruption may develop a trace in the central nervous system. We do not know the mechanism of cell loss. It could be related to the possible increase in CRH induced by handling. Administration of CRH during the neonatal period reduces the number of neurons in the CA3 hippocampus of adult rats, which is related to glutamatergic mechanisms and enhanced intracellular calcium (Brunson et al., 2001). However, it is difficult to conceive that changes in CRH could cause a reduction in the number of cells in the pPVN due to the fact that handling in fact reduces CRH mRNA expression in the PVN (Fenoglio et al., 2004). Moreover, handling does not seem to alter plasma corticosterone in the stress hypo-responsive period (Sapolsky and Meaney, 1986), except on the 2nd day after delivery when it may induce a significant rise in plasma corticosterone concentrations (McCormick et al., 1998). A recent study (Yossuck et al., 2006) showed that the administration of corticosteroid on postnatal day 1 induced no change in the volume of several brain structures including the amygdaloid nuclei.

An alternative explanation for the reduction in the total number of cells in the PVN and SON is the effect of the noradrenergic system. Neurotransmitters, like noradrenaline, can exert trophic functions in cell replication, differentiation and cell death (Kreider et al., 2004). The effects of environmental stimulation can act on beta-adrenoreceptors (Wagner et al., 1995) and increase cell replication, through the activation of intracellular mechanisms involving c-AMP. However, an overt stimulation of beta-adrenoreceptors can, in fact, induce cell death. Thus, we may speculate that the decrease in the number of cells observed in the present study could be due to an excess of environmental stimulation, due to experimental manipulation and increased licking/grooming by the dam, which probably occurred after the handling procedure.

Moreover, we do not know whether the reduction in the number of cells was uniform within several types of neurons, or alternatively, whether it was restricted to a specific sub-population of neurons. Results show that the parvocellular OT-producing neurons of the PVN decreased in adult females handled during the neonatal period. However, it is possible that other sub-populations of neurons, for instance, the CRH or AVP

cells, have different fates. Another aspect to consider is that we studied females and previous studies have shown gender differences on the effects of neonatal handling (Papaioannou et al., 2002; Park et al., 2003). In the forced swimming stress test, neonatal handling reduced the capacity of females to cope with chronic stress, while the opposite was observed in males (Papaioannou et al., 2002). Thus, the structural alterations here described may not be true for males. However, in the locus coeruleus, handling decreased the number of cells in both males and females, although the effects on females were more pronounced than males (Lucion et al., 2003).

In conclusion, early-life stimulation may reduce the total number of cells in the SON and the parvocellular region of the PVN. Results also indicate a reduction in the number of OT-positive cells in adult females. Present study confirms previous one (Lucion et al., 2003) that neonatal handling can induce plastic changes in the central nervous system, besides the hormonal and behavioral alterations, extensively described in adult animals. The impact of handling on cell loss was detected 24 h after the 10-day handling stimulation period and was also detected in adulthood, indicating a stable morphological trace. We suggest that experimental handling may have caused a disruption in the mother–infant relationship, which may in turn induce neurological sequelae.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Animals

Pregnant females from colonies of the Federal University of Rio Grande do Sul were brought to the animal room in our laboratory. Approximately 7 days before delivery, they were housed individually and the presence of pups was checked twice a day (beginning and end of the light period). The day of birth was postnatal day 0. In the next day, the number of pups was culled to 8 per dam by randomly removing some of them with minimal contact with the remaining pups and the dam. After weaning (postnatal day 21), the females were housed in same-sex groups of 2–4 per cage (41 cm × 34 cm × 17 cm). The animals were maintained on a 12-h light–dark cycle (lights on at 6:00 a.m.), the room temperature was  $22 \pm 1$  °C, and water and food (Rodent chow, Nutrilab, Colombo, Brazil) were available at all times. Experiments were performed in accordance with the National Institute of Health (NIH) guidelines (1986) and the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 4.2. Neonatal handling and experimental groups

The pups were divided into two groups: nonhandled, they were not manipulated either by the researchers or by the caretakers from the 1st to the 10th postnatal day, with bedding being changed twice a week only from the 10th day on; and handled, the pups were touched daily for 1 min during the first 10 days after birth. Initially, the litter and the dam were placed in their home cage and taken to a quiet room next to the animal facility. We maintained similar light periods and temperature. The dam was placed in another cage next to the home cage, and then the experimenter gently handled all pups at the same time using both hands, covered with fine latex gloves, for

1 min. After handling, all pups were returned to the nest at the same time and the dam was placed back in the home cage. The pups were handled at a distance of about 1 to 2 m from the dam. The total time of mother–infant separation was approximately 2 min. Handling was performed during the light period of the photoperiod cycle (Gomes et al., 1999; Lucion et al., 2003; Padoin et al., 2001; Severino et al., 2004).

In the experiment in which neurons were estimated by the dissector method, the females of both groups were studied at 2 different ages: 11 (neonatal period) and 90 (adult) days old. The number of animals in each experimental group (nonhandled and handled) and age (11 and 90 days old) was 6. In the experiment in which the expression of GFAP was estimated by optical density (OD) and the OT-positive cells were counted, adult nonhandled and handled females were studied and the number of animals in each group was 5 and 6, respectively. Within the experimental groups, the animals were nonsiblings (each subject from a different litter). Adult females were studied in diestrus. The estrous cycle was verified in the morning by taking vaginal smears over a period of 15 days and only females with at least 3 regular cycles were studied.

### 4.3. Histological procedures for cell counting

Before the cell counting experiments, body weight (g) of handled and nonhandled animals (6 in each group and age) was obtained. Females were anesthetized with xylazine (0.1 ml/g body weight, i.m.) and ketamine (0.1 ml/g body weight, i.m.) and were perfused with phosphate buffered saline (PBS) with heparin (50 ml in the 11-day-old and 100 ml in the 90-day-old rats) followed by paraformaldehyde 4% diluted in phosphate buffer 0.1 M (pH 7.4) at 4 °C at the same flow rate and total amount. The perfusion rate was approximately 1 drop in 7 s for the 11-day and 1 drop in 5 s for the 90-day-old females. After the perfusion, the brain was extracted from the skull, weighed, and placed in the fixing solution for 72 h. After fixation, the brain was washed for 1 h in running water and then dehydrated in different concentrations of ethanol (70%, 80%, 90%, 95% and absolute ethanol) and cleared with xylol. They were included in the final position with a paraplastic resin (Histosec — Merck). Coronal serial sections (6 µm thick) were obtained with a microtome and serially collected on glued slides. The tissue was stained with cresyl violet. After staining, the sections were dehydrated through an ethanol series and coverslipped with Entellan (Merck).

### 4.4. Estimation of the volume of the nuclei

The PVN and SON were identified according to a rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1997). The main references used to locate the PVN were the presence of the fornix and the 3rd ventricle. The parvocellular region was situated within 0.80 and 2.12 mm and the magnocellular region within 1.80 and 2.12 mm in relation to the bregma suture. The optic tract was used as a reference to localize the SON (0.80 and 1.80 mm in relation to the bregma suture). The cells and volume of the decussation and retrochiasmatic nucleus of the SON were not analyzed.

The PVN was divided in the parvocellular (pPVN) and the magnocellular (mPVN) regions. According to the rat brain atlas

(Paxinos and Watson, 1997), the anterior parvocellular (PaAP), medial parvocellular (PaMP), ventral (PaV), posterior parvocellular (PaPo) and dorsal capsule (PaDC) were considered the parvocellular region (pPVN). The anterior magnocellular (PaAM) and lateral magnocellular (PaLM) were considered the magnocellular region (mPVN).

The volume of each nucleus was estimated according to the Cavalieri principle. We used an optic microscope (Zeiss Axioscop2) with a 10× lens and a video camera (CCD video camera module) attached to a computer (Apple Macintosh 8600-300) and an image analyzing system (NIH Image 1.62f, Rasband, 1996). The area of the nucleus, expressed in  $\text{mm}^2$ , was measured starting from the 3rd section at intervals of 10. The volume ( $\text{mm}^3$ ) of the right and left-side PVN and SON was estimated by multiplying the sum of the areas by the interval between sections (60  $\mu\text{m}$ ).

#### 4.5. Estimation of the total number of cells

In order to characterize the cells to be counted, we measured the size (in microns) of the cell body and the nucleus of 30 neurons (6 rats and 5 cells per structure) in the nuclei analyzed of nonhandled adult rats. We used the same light microscope, video camera and computer with image analysis system described in the analysis of the volume. The largest diameter of the soma of the neurons varied from 6 to 12  $\mu\text{m}$  in the pPVN, from 13 to 25  $\mu\text{m}$  in the mPVN and from 15 to 25  $\mu\text{m}$  in the SON. Glial cells were smaller with a larger nucleus and deeply stained nucleolus compared to the neurons.

The disector method used in the present study to estimate the total number of neurons is a three-dimensional probe that samples structures proportional to their number without regard to the size or shape of the structure (Mandarim-de-Lacerda, 2003; Sterio et al., 1984). In a disector, two sections are used to create a sampling volume with an upper, reference section, containing a test frame. The test frame, the unbiased counting frame, ensures that all objects are counted with equal probability (Evans et al., 2004; Sterio et al., 1984). Sections were viewed with a 100× planachromatic immersion oil objective on a Leica DMRBE microscope (NA=1.25) to identify neuron nuclei. For each frame, the thickness of the section was measured by focusing on the upper and lower section surfaces verified objectively by employing an auto-focus device and read-out (the microscope was equipped with a z-axis motorized focus controller micro-cator with a resolution of 0.1  $\mu\text{m}$ ). The neurons with a well-focused nucleus in the lookup, but not in the lookdown, were counted. Another condition was that the nucleus of the cell should be inside the test area, but could not touch 2 borderlines of the test area, previously chosen (forbidden lines).

The numerical density (Nv) of neurons (number of cells per  $\text{mm}^3$ ) was determined by the use of 10 random disector pairs for each nucleus and rat. Each section was used for only one counting. This sampling design was based on a pilot experiment to determine the inter-animal variability. Estimates of relative variance of around 10% were considered acceptable (Gundersen et al., 1988). The estimated total number of cells (N) was calculated by multiplying the Nv by the volume of the nucleus previously estimated according to the Cavalieri principle. For reasons of efficiency, we analyzed the nuclei of the neurons (one nucleus represented one neuron). The number of cell nuclei was

counted inside a frame of 2304  $\mu\text{m}^2$  in the lookup plane provided that they did not intersect the right and inferior exclusion edges of the frame (forbidden lines) (Gundersen et al., 1977). The center of nucleus, not the top of nucleus, was measured. The center of the nucleus was located by focusing on the clear nuclear edge and clearly defined nuclear chromatin to prevent an asymmetric distribution profile (Howard and Reed, 2005). The thickness of the disector (t) was 3  $\mu\text{m}$ , representing 1/4 to 1/3 of the height of the neuron nuclei, which in practice is the more important constraint on section thickness (Gundersen and Osterby, 1981). The same counting procedures were applied for all groups and thus the comparisons may be appropriate to detect the effects of neonatal handling on the development of the nuclei studied.

#### 4.6. Immunohistochemistry for GFAP

Adult females (90 days old) were anesthetized with thiopental sodium (50 mg/kg body weight, i.p.) and were perfused with 100 ml of phosphate buffered saline with heparin followed by 4% paraformaldehyde diluted in phosphate buffer 0.1 M (pH 7.4) at 4 °C at the same flow rate and total amount. After the perfusion, the brain was extracted from the skull and placed into the fixing solution for 4 h. After fixation, the brain was cryoprotected with a 15% sucrose/PBS solution until the sample was saturated followed by immersion in a 30% sucrose/PBS solution. The sample was then frozen in cooled isopentane. Coronal serial sections (50  $\mu\text{m}$  thick) of the PVN and SON were obtained in the cryostat, using the atlas (Paxinos and Watson, 1997) for anatomical references. The samples were collected in PBS solution with an interval of 100  $\mu\text{m}$ . The tissue was processed for GFAP immunohistochemistry using the antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) procedure. Free-floating sections were treated in 10% methanol and 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 30 min and washed carefully. Then, the sections were pre-incubated in 3% normal goat serum (NGS) in PBS containing 0.3% Triton X-100 (PBS-Tx, Sigma Chemical Co.) for 30 min and incubated with polyclonal GFAP antiserum obtained in rabbit (Sigma Chemical Co.) diluted 1:150 in 3% NGS in PBS-Tx for 48 h at 4 °C. After washing several times with PBS-Tx, sections were incubated in an anti-rabbit IgG solution diluted 1:50 in PBS-Tx at room temperature for 2 h. Sections were washed again in PBS and incubated in rabbit PAP (Sigma Chemical Co.) diluted 1:500 in PBS for 2 h at room temperature. The immunohistochemical reaction was performed by incubating the sections in a histochemical medium containing 0.06% 3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Chemical Co.) dissolved in PBS for 10 min and then in a similar solution containing 1  $\mu\text{M}$  of 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  per ml of DAB medium for 10 min. Afterwards, the sections were rinsed in PBS, dehydrated in ethanol, cleared with xylene and covered with Entellan and coverslips. Control sections were prepared by omitting the primary antibody and replacing it with PBS. The tissue of all animals in this experiment was processed (perfusion and immunodetection) in the same day using the same solutions to avoid changes in the background and differences in the chromogen reaction (Rasia-Filho et al., 2002).

#### 4.7. Optical density (OD) of GFAP-positive cells

The intensity of the reaction product of GFAP immunohistochemistry was measured by optical densitometry (Rasia-Filho

et al., 2002), using a Nikon Eclipse E-600 microscope coupled to a Pro-Series High performance CCD camera and Image Pro Plus Software 4.1 (Media Cybernetics, USA). The images obtained from the sections were digitized and converted in an 8-bit gray scale (0–255). To estimate the regional optical density generated by GFAP immunoreaction in the pPVN, mPVN and SON, 3 areas of interest (AOI) were employed, measuring 43,264  $\mu\text{m}^2$ , 16,378  $\mu\text{m}^2$  and 17,401  $\mu\text{m}^2$ , respectively. The size of AOIs was determined to avoid analysis of picture elements (pixels) outside of the nucleus and to gather a significant number of pixels from the different sub-regions of the SON, mPVN, and pPVN. A possible change in the intracellular GFAP immunoreactivity was evaluated by processing densitometry of an astrocytic soma, using the same estimating procedures described above, but with an AOI measuring 10.95  $\mu\text{m}^2$ . For the regional optical densitometry, an objective lens of 10 $\times$  was used. For the intracellular densitometry, an oil immersion objective of 100 $\times$  was employed.

Both the left and right hemispheres of brains were analyzed and, at least 5 readings were performed in each nucleus per side. To avoid misleading results, all lighting conditions and magnifications were held constant for different sections. Blood vessels and other artifacts were avoided. Moreover, the investigator was unaware of the experimental group from which the slices were obtained during the analysis. Regional and intracellular optical densities were obtained using the Lambert–Beer formula:  $\text{OD} = \log_{10} 1/T$ , where OD is the optical density and T is the transmittance. The background correction and the subtraction of background staining were performed according to our previously described protocol (Xavier et al., 2005).

#### 4.8. Immunohistochemistry for oxytocin (OT)

Adult females in diestrus were studied. The preparation of the tissue followed the same procedure as described for the immunohistochemistry of GFAP. Sections (50  $\mu\text{m}$  each) were placed in small containers with PBS, which were numbered in the antero-posterior order and marked according to their respective group. Samples were collected in PBS solution at an interval of 100  $\mu\text{m}$ . Tissue was immersed in  $\text{H}_2\text{O}_2$  and methanol for 30 min and normal goat serum to prevent nonspecific antibody binding for 30 min. The primary polyclonal antibody for OT (Chemicon International, CA) was diluted with BSA in PBS (1:400) and applied to the sections for 48 h at 4  $^\circ\text{C}$ . The detection protocol included sequential incubation of anti-rabbit IgG (1/200) and ABC complex (Vector) solutions for 90 min each. Immunoreactive neurons were visualized in a developer containing DAB (Sigma) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Tris HCl buffer (pH 7.6). As a negative control, sections were processed as above but in the absence of primary antibody. After finishing the immunohistochemical procedure, the sections were dried on previously marked slides for 24 h.

Cell bodies with positive staining in the PVN and SON nuclei were counted in both hemispheres by two trained observers. Only stained cells in the first focus under a 40 $\times$  magnification were counted. The size of each stained cell was measured with an optical light microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) attached to a video camera (Sony CCD video camera module) and a computer (Apple Macintosh 8600-300) with image analyzing software (NIH image 1.62f, Rasband,

1996). The cell was considered parvocellular if the major diameter was 6–12  $\mu\text{m}$  and magnocellular if larger than 13  $\mu\text{m}$ . Data were expressed as the mean number of OT-positive stained cells by section analyzed.

#### 4.9. Statistics

The values of the estimated number of cells in the nucleus (N) and the volume of the nucleus ( $\text{mm}^3$ ) were expressed as mean  $\pm$  SEM. Results were compared between groups (non-handled and handled), ages (11 and 90 days of age) and sides of the brain (right and left) by a two-way ANOVA, with side of the brain as a repeated measure.

Regional and intracellular OD of GFAP and the number of OT-positive cells were expressed as mean  $\pm$  SEM and compared between groups (nonhandled and handled) and sides of the brain (right and left) by one-way ANOVA, with side of the brain as a repeated measure. In all cases, when appropriate, a post hoc Newman–Keuls test comparison was used to analyze individual differences.

The body weight was also expressed as mean  $\pm$  SEM and compared between the handled and nonhandled groups within age by the Student's t test. In all cases, the accepted level of significance was  $p < 0.05$ .

#### Acknowledgments

The authors are indebted to FAPESP, CAPES and CNPq for financial support.

#### REFERENCES

- Avishai-Eliner, S., Eghbal-Ahmadi, M., Tabachnick, E., Brunson, K.L., Baram, T.Z., 2001. Down-regulation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid (mRNA) precedes early-life experience-induced changes in hippocampal glucocorticoid receptor mRNA. *Endocrinology* 142, 89–97.
- Brunson, K.L., Eghbal-Ahmadi, M., Bender, R., Bender, R., Chen, Y., Baram, T.Z., 2001. Long-term, progressive hippocampal cell loss and dysfunction induced by early-life administration of corticotropin-releasing hormone reproduce the effects of early-life stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8856–8861.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1998. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5335–5340.
- Caldji, C., Francis, D., Sharma, S., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 2000. The effects of early rearing environment on the development of GABAA and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology* 22, 219–229.
- Cameron, N.M., Champagne, F.A., Parent, C., Fish, E.W., Ozaki-Kuroda, K., Meaney, M.J., 2005. The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 843–865.
- Crespo, D., Ramos, J., Gonzalez, C., Fernández-Viadero, C., 1990. The supraoptic nucleus: a morphological and quantitative study in control and hypophysectomised rats. *J. Anat.* 169, 115–123.

- Cushing, B.S., Carter, C.S., 2000. Peripheral pulses of oxytocin increase partner preferences in female, but not male, prairie voles. *Horm. Behav.* 37, 49–56.
- Evans, S.M., Janson, A.M., Nyengaard, J.R., 2004. *Quantitative Methods in Neuroscience. A Neuroanatomical Approach.* Oxford Univ. Press, Oxford.
- Fenoglio, K.A., Brunson, K.L., Avishai-Eliner, S., Chen, Y., Baram, T.Z., 2004. Region-specific onset of handling-induced changes in corticotropin-releasing factor and glucocorticoid receptor expression. *Endocrinology* 145, 2702–2706.
- Fenoglio, K.A., Chen, Y., Baram, T.A., 2006. Neuroplasticity of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis early in life requires recurrent recruitment of stress-regulating brain regions. *J. Neurosci.* 26, 2434–2442.
- Gomes, C.M., Frantz, P.J., Sanvitto, G.L., Anselmo-Franci, J.A., Lucion, A.B., 1999. Neonatal handling induces anovulatory estrous in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 1239–1242.
- Gomes, C.M., Rainecki, C., Ramos, P.P., Severino, G.S., Helena, C.V.V., Anselmo-Franci, J.A., Franci, C.R., Sanvitto, G.L., 2005. Neonatal handling and reproductive function in female rats. *J. Endocrinol.* 184, 435–445.
- Gonzalez, A.S., Rodríguez Echandia, E.L., Cabrera, R., Fóscolo, M.R., Fracchia, L.N., 1990. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. I. Effects on forced swim behavior and endocrine responses. *Physiol. Behav.* 47, 735–741.
- Gundersen, H.J., 1977. Notes on the estimation on the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J. Microsc.* 111, 219–223.
- Gundersen, H.J., Osterby, R., 1981. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or “do more less well”. *J. Microsc.* 121, 65–73.
- Gundersen, H.J., Bagger, P., Bendtsen, T.F., Evans, S.M., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., 1988. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96, 857–881.
- Heim, C., Owens, M.J., Plotsky, P.M., Nemeroff, C.B., 1997. Endocrine factors in the pathophysiology of mental disorders. Persistent changes in corticotropin-releasing factor systems due to early life stress: relationship to the pathophysiology of major depression and post-traumatic stress disorder. *Psychopharmacol. Bull.* 33, 185–192.
- Howard, C.V., Reed, M.G., 2005. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, 2nd edition. New York BIOS: Scientific Publication.
- Hsu, F.-C., Zhang, G.-J., Raol, Y.S.H., Valentino, R.J., Coulter, D.A., Brooks-Kayal, A.R., 2003. Repeated neonatal handling with maternal separation permanently alters hippocampal GABA<sub>A</sub> receptors and behavioral stress responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12213–12218.
- Kreider, M.L., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2004. Beta-adrenoceptor modulation of transiently overexpressed alpha2-adrenoceptors in brain and peripheral tissues: cellular mechanisms underlying the developmental toxicity of terbutaline. *Brain Res. Bull.* 62, 305–314.
- Liu, D., Diorio, J., Tanenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic–pituitary–adrenal response to stress. *Science* 277, 1659–1662.
- Lucion, A.B., Pereira, F.M., Winkelmann, E.C., Sanvitto, G.L., Anselmo-Franci, J.A., 2003. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behav. Neurosci.* 117, 894–903.
- Madrugá, C.S., Xavier, L.L., Achaval, M., Sanvitto, G.L., Lucion, A.B., 2006. Early handling, but not maternal separation, decreases emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine. *Behav. Brain Res.* 166, 241–246.
- Mandarim-de-Lacerda, C.A., 2003. Stereological tools in biomedical research. *An. Acad. Bras. Cienc.* 55, 187–195.
- Mazaro, R., Lamano-Carvalho, T.L., 2006. Prolonged deleterious effects of neonatal handling on reproductive parameters of pubertal male rats. *Reprod. Fertil. Dev.* 18, 497–500.
- McCormick, C.M., Kehoe, P., Kovacs, S., 1998. Corticosterone release in response to repeated, short episodes of neonatal isolation: evidence of sensitization. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16, 175–185.
- Meaney, M.J., Diorio, J., Widdowson, J., Laplante, P., Cladj, C., Seckl, R., Plotsky, P.M., 1996. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical response to stress. *Dev. Neurosci.* 18, 49–72.
- Meerlo, P., Horvath, K.M., Nagy, G.M., Bohus, B., Koolhaas, J.M., 1999. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J. Neuroendocrinol.* 11, 925–933.
- Nemeroff, C.B., 2004. Early-life adversity, CRF dysregulation, and vulnerability to mood and anxiety disorders. *Psychopharmacol. Bull.* 38, 14–20.
- Neumann, I.D., Wigger, A., Torner, L., Holsboer, F., Landgraf, R., 2000. Brain oxytocin inhibits basal and stress-induced activity of the hypothalamo–pituitary–adrenal axis in male and female rats: partial action within the paraventricular nucleus. *J. Neuroendocrinol.* 12, 235–243.
- Padoin, M.J., Cadore, L.P., Gomes, C.M., Barros, H.M.T., Lucion, A.B., 2001. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavioral of rats. *Behav. Neurosci.* 115, 1332–1340.
- Papaioannou, A., Dafni, U., Alikaridis, F., Bolaris, S., Stylianopoulou, F., 2002. Effects of neonatal handling on basal and stress-induced monoamine levels in the male and female rat brain. *Neuroscience* 114, 195–206.
- Park, M.K., Hoang, T.A., Belluzzi, J.D., Leslie, F.M., 2003. Gender specific effect of neonatal handling on stress reactivity of adolescent rats. *J. Neuroendocrinol.* 15, 289–295.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd ed. Academic Press, San Diego.
- Pedersen, C.A., Boccia, M.L., 2002. Oxytocin maintains as well as initiates female sexual behavior: effects of a highly selective oxytocin antagonist. *Horm. Behav.* 41, 170–177.
- Pedersen, C.A., Boccia, M.L., 2006. Vasopressin interaction with oxytocin in the control of female sexual behavior. *Neuroscience* 139, 843–851.
- Pryce, C.R., Bettschen, D., Bahr, N.I., Feldon, J., 2001. Comparison of the effects of infant handling, isolation, and nonhandling on acoustic startle, prepulse inhibition, locomotion, and HPA activity in the adult rat. *Behav. Neurosci.* 115, 71–83.
- Rasband, W., 1996. NIH Image [Computer software]. Retrieved May 2002, from <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/download.html>.
- Rasia-Filho, A.A., Xavier, L.L., Santos, P., Gehlen, G., Achaval, M., 2002. Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats. *Brain Res. Bull.* 58, 65–75.
- Rodrigues, A.L., Arteni, N.S., Zylbersztejn, C., Abel D., Chazan, R., Viola, G., Achaval, L., Xavier M., Netto, C.A., 2004. Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia–ischemia. *Brain Res.* 1002, 94–99.
- Sapolsky, R.M., Meaney, M.J., 1986. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res.* 396, 64–76.
- Severino, G.S., Fossati, I.A.M., Padoin, M.J., Gomes, C.M., Trevizan, L., Sanvitto, G.L., Franci, C.R., Anselmo-Franci, J.A., Lucion, A.B., 2004. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiol. Behav.* 81, 489–498.

- Sterio, D.C., 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microsc.* 134, 127–136.
- Tang, A.C., Reeb, B.C., 2004. Neonatal novelty exposure, dynamics of brain asymmetry, and social recognition memory. *Dev. Psychobiol.* 44, 84–93.
- Tejedor-Real, P., Costela, C., Gilbert-Rahola, J., 1998. Neonatal handling reduces emotional reactivity and susceptibility to learned helplessness: involvement of catecholaminergic systems. *Life Sci.* 62, 37–50.
- Wagner, J.P., Seidler, F.J., Lappi, S.E., McCook, E.C., Slotkin, T.A., 1995. Role of presynaptic input in the ontogeny of adrenergic cell signaling in rat brain: beta receptors, adenylate cyclase and c-fos protooncogene expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273, 415–426.
- Wallner, B., Dittami, J., Machatschke, I., 2006. Social stimuli cause changes in plasma oxytocin and behavior in guinea pigs. *Biol. Res.* 39, 251–258.
- Xavier, L.L., Viola, G.G., Ferraz, A.C., Cunha, C., Deonizio, J.M.D., Netto, C.A., Achaval, M., 2005. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res. Protoc.* 16, 58–64.
- Yossuck, P., Kraspulis, M., Salm, A.K., 2006. Perinatal corticosteroid effect on amygdala and hippocampus volume during brain development in the rat model. *Early Hum. Dev.* 82, 267–272.
- Young, L.J., Murphy-Young, A.Z., Hammock, E.A.D., 2005. Anatomy and neurochemistry of the pair bond. *J. Comp. Neurol.* 493, 51–57.



## Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats

Anelise S. Todeschin<sup>a</sup>, Elisa C. Winkelmann-Duarte<sup>b</sup>, Maria Helena Vianna Jacob<sup>a</sup>, Bruno Carlo Cerpa Aranda<sup>a</sup>, Silvana Jacobs<sup>a</sup>, Marilda C. Fernandes<sup>c</sup>, Maria Flavia Marques Ribeiro<sup>a</sup>, Gilberto Luiz Sanvitto<sup>a</sup>, Aldo Bolten Lucion<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, 90050-170, RS, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Pesquisa em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 September 2008

Revised 12 March 2009

Accepted 12 March 2009

Available online 24 March 2009

#### Keywords:

Neonatal stress

Paraventricular nucleus

Supraoptic nucleus

Social behavior

Neuroplasticity

Immunohistochemistry

Male and female rats

### ABSTRACT

Early-life environmental events can induce profound long-lasting changes in several behavioral and neuroendocrine systems. The neonatal handling procedure, which involves repeated brief maternal separations followed by experimental manipulations, reduces stress responses and sexual behavior in adult rats. The purpose of this study was to analyze the effects of neonatal handling on social behaviors of male and female rats in adulthood, as manifest by the results of social memory and social interaction tests. The number of oxytocin (OT) and vasopressin (VP) neurons in the paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei of hypothalamus were also analyzed. The results did not demonstrate impairment of social memory. Notwithstanding, handling did reduce social investigative interaction and increase aggressive behavior in males, but did not do so in females. Furthermore, in both males and females, handling was linked with reduced number of OT-neurons in the parvocellular region of the PVN, while no differences were detected in the magnocellular PVN or the SON. On the other hand, handled males exhibited increased number of VP-neurons in the magnocellular zone of the PVN. We may conclude that the repeated brief maternal separations can reduce affiliative social behavior in adult male rats. Moreover, the disruption of the mother–infant relationship caused by the handling procedure induced long-lasting morphological changes in critical neuroendocrine areas that are involved in social bonding in mammals.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Exposure to stress early in life can induce an increased vulnerability to mood disorders later in life (Heim et al., 2008, 2004; Sanchez et al., 2001). Indeed, the origin of many adult diseases such as depression, anxiety, or impulse control disorders, can be found in infancy (Kaffman and Meaney, 2007; Swain et al., 2007).

Neonatal handling has been used experimentally with rodents in order to analyze the long-lasting effects of environmental intervention on the mother–infant relationship (Denenberg, 1964). In rats, handling has been shown to reduce fear and stress responses (Arborelius and Enklund, 2007; Caldji et al., 2000; Levine, 1962; Levine et al., 1967; Meerlo et al., 1999; Padoin et al., 2001; Severino et al., 2004) as well as sexual behavior and reproductive functions (Gomes et al., 2005; Padoin et al., 2001; Rainecki et al., 2008). Neonatal handling can also induce stable morphological changes to the central

nervous system, reducing the number of cells in the paraventricular nucleus [PVN] of the hypothalamus (Winkelmann-Duarte et al., 2007) and the locus coeruleus [LC] (Lucion et al., 2003). Although the handling procedure does not reproduce a natural environmental intervention, the wide range of long-lasting changes may nevertheless indicate that biologically relevant pathways are activated by the repeated brief separations from the mother combined with handling.

Central oxytocin (OT) has been related to social behaviors, such as maternal and sexual, and also to reduced anxiety (Engelmann et al., 2000; Lim and Young, 2006; Ludwig and Leng, 2006; Pedersen and Boccia, 2002; Veenema and Neumann, 2008). Moreover, during the neonatal period OT appears to exert long-lasting plastic effects on peptide receptors (Bales et al., 2007). Vasopressin (VP) is also a peptide that has been linked with social memory (Bielsky and Young, 2004; Caldwell et al., 2008) and aggression (Caldwell et al., 2008; Veenema et al., 2006). In family-reared children, OT and VP levels increase after physical contact with their mothers, while children that have been neglected do not exhibit this increase (Fries et al., 2005). Both of these neuropeptides appear to play a crucial role in social

\* Corresponding author. Fax: +55 51 3308 3656.

E-mail address: [alucion@ufrgs.br](mailto:alucion@ufrgs.br) (A.B. Lucion).

bonding (Hammock and Young, 2006; Keverne and Curley, 2004; Wersinger et al., 2004; Young and Wang, 2004) and also induce organizational effects on the development of social behavior (Cushing and Kramer, 2005; Kramer et al., 2006).

The purpose of this study was to analyze the effects of neonatal handling on social behaviors of male and female rats in adulthood (at approximately 90 days), as manifest by the results of social memory and social interaction tests. Considering the role of OT and VP in social behaviors, and that the effects of handling have been detected several weeks after intervention, we assume that the handling procedure induces stable morphological changes in the peptidergic system. The number of VP and OT-immunoreactive neurons in the PVN and in the supraoptic nucleus (SON) were counted and compared between rats that had or had not been handled in the early postnatal period.

## Methods

### Animals

Pregnant Wistar female rats were obtained from the colony of the Federal University of Rio Grande do Sul. They were housed in our laboratory animal facility and the day of birth (day 0) was controlled. The number of pups was culled to 8 per dam. After weaning (postnatal day 21, [PND21]), animals were housed in groups of 2 to 4 per cage (41 cm × 34 cm × 17 cm), according to body weight, at a room temperature of 22 °C. Lights were on from 6:00 to 18:00. Rodent chow (Nutrilab, Brazil) and water were available at all times. Both males and females were studied and were kept in same-sex cages until the tests. Sufficient litters were studied so that only one male and one female pup per litter were used in each experimental group. Experiments were performed in accordance with the NIH guide for animal research and were approved by the university's Research Ethics Committee.

### Neonatal handling and experimental groups

Animals were divided into the following groups: (1) not handled (NH, no handling during the first 10 days after birth) and (2) handled (H, pups were separated from the mother and handled for 1 min each day from PND 1 to 10). This handling procedure was modified from early studies (Levine et al., 1967) and has been described in previous publications (Severino et al., 2004; Raineki et al., 2008; Winkelmann-Duarte et al., 2007). Briefly, the mother was removed from the home cage and the investigator, wearing thin latex gloves, gently handled all pups at the same time for 1 min, using both hands. After handling, they were returned to the nest at the same time as the mother. The cage bedding was not changed in either of the groups for the first 10 days. When females reached approximately 70 days, vaginal smears were taken daily and only those rats showing at least three consecutive regular 4-day estrous cycles were used in the experiments, and all females were tested while in diestrus. The handling procedure was not exactly the same as described in the early works (Levine et al., 1967). However, other studies (Fenoglio et al., 2006a; Ladd et al., 2005; Pryce et al., 2003) have also used modified protocols of handling procedure, but no major discrepancies in the long-lasting effects were observed, provided that separation from the mother is brief and repeated (Fenoglio et al., 2006b). Previous studies conducted in our laboratory (Padoin et al., 2001; Severino et al., 2004) have also reached similar conclusions concerning reduced anxiety-like behaviors and stress responses.

### Behavioral testing

#### Social memory test

The social memory test (habituation–dishabituation) was based on a previous study (Winslow and Camacho, 1995). The cage used for testing was a clear Plexiglas box of the same dimensions as the home

cage. Prior to the test, animals were placed in the testing cage every day for at least 7 days in order to become accustomed to this environment. On the testing day, the rat to be studied was placed in the testing cage at the start of the dark phase of the day–night cycle and left there for 20 min. After this period, a juvenile male rat (21–30 days old) was introduced into the cage containing the adult rat being observed. The juvenile was left in the testing cage with the adult for 2 min. During this period the behavior of the adult rat was recorded. This procedure was repeated 4 times (sessions S1 to S4) with the same juvenile intruder. After that, a different juvenile of approximately the same age as the previous one was placed in the testing cage, with the adult (session S5). There was an 18 min interval between each session. Animals were videotaped and their behavior scored at a later date by a single trained observer who was blind to experimental group and worked with a computer-assisted data acquisition system (Observer, Noldus, Netherlands). The duration of social investigation (sniffing the juvenile) was analyzed. The adult rat's habituation to the juvenile intruder was evaluated in sessions S1 to S4. Memory was verified in session S5. In comparison with S4, it was expected that the introduction of a different juvenile intruder would result in increased social investigation by the adult animal, which, theoretically, would return to approximately the same levels of sniffing the novel juvenile as it had exhibited towards the first juvenile when introduced in S1.

#### Social interaction test

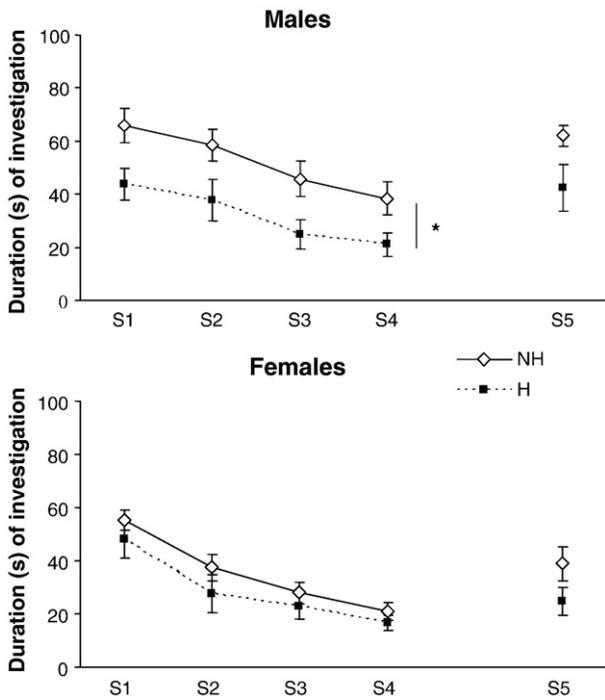
This test was also based on a previous study (Patin et al., 2005). The test apparatus consisted of 3 clear Plexiglas boxes (all 34 cm × 40 cm × 24 cm). Two of the boxes (A and B) were each connected to a third (neutral, N) by a corridor and a door, but not to each other. With the connecting doors closed, two adult rats from different litters, but with similar body weights, were placed into boxes A and B at the same time, one in each box. Each pair consisted of two rats of the same sex and from the same experimental group (H or NH). Therefore, 4 groups were observed: H males, NH males, H females and NH females. Each rat remained confined to its own box, with no access to the N box, for 24 h. Food and water were available ad libitum in boxes A and B.

The observational part of the test was performed at the start of the dark phase of the light–dark cycle. First, the doors to compartments A and B were opened at the same time, allowing both rats the possibility of exploring all three compartments, A, B and N. The test lasted 15 min, during which time the following variables were recorded, irrespective of which compartment they occurred in: latency of the first social investigation (sniffing the other rat); latency of first attack; number and duration of attacks, defined as threats, boxing, biting or offensive rearing (most attacks were very quick and lasted just a few seconds); time spent in non-social behavior (when rats were in separate compartments); and time spent in active social interaction (sniffing, grooming, licking, mounting or crawling under or over the other rat).

#### Immunohistochemistry for OT and VP in the PVN and SON

Tissues were prepared according to procedures described by Winkelmann-Duarte et al. (2007). Briefly, serial sections (50 μm each) were collected in PBS solution at 100 μm intervals throughout the nuclei. Tissues were immersed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and methanol for 30 min, and then in normal goat serum for another 30 min to prevent nonspecific antibody binding.

Oxytocin immunostaining was carried out using primary antibody (OT Monoclonal AntiBody PS38, a generous gift from Dr. H. Gainer, NIH, USA) at 4 °C and at a dilution of 1:50, applied overnight to brain sections after incubation in normal goat serum (Ben-Barak et al., 1985). Tissues were then washed with PBS and incubated with anti-mouse IgG (Vector, 1:100) for 120 min. Vasopressin immunostaining used primary antibody (VP Monoclonal AntiBody PS41, also donated by Dr. H. Gainer, NIH, USA) diluted with BSA in PBS (1:50) and applied



**Fig. 1.** Effects of neonatal handling on the social memory test (habituation–dishabituation paradigm). Social investigation time (mean  $\pm$  SEM) in 4 repeated 2-min exposures to the same juvenile (S1–S4) followed by 1 final 2-min exposure to a different juvenile (S5) with an inter-trial interval of 18 min was compared between not handled (NH) and handled (H) adult male and female rats. Not handled control rats were kept undisturbed during the neonatal period and H animals were gently manipulated for 1 min daily from the 1st to the 10th post natal day. Data were analyzed using one-way ANOVA with time as repeated measure. Number of animals: NH males = 13; H males = 13; NH females = 13; H females = 13. \*Indicates significant main effect for group (NH versus H).

to the sections overnight at 4 °C. The detection protocol included sequential incubation of anti-mouse IgG (1/100) and ABC complex (Vector) solutions for 120 min each. Immunoreactive neurons were viewed in a developer containing DAB (Sigma) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Tris HCl buffer (pH 7.6). For the negative control, sections were processed as above, but in the absence of the primary antibody.

The sections were placed on previously glued slides for 24 h. First, the size of the cell body of the positive stained cells was measured using an optical light microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) attached to a video camera (Sony CCD video camera module) and a computer (Apple Macintosh 8600-300) running image analyzing software (NIH image 1.62f, Rasband, 1996). Cells were considered parvocellular when the cell body diameter was 6 to 12  $\mu$ m, and magnocellular if larger than 13  $\mu$ m. OT and VP-positive neurons were counted within the test-area in the PVN and SON in both hemispheres by a trained observer under 100 $\times$  magnification. Data were expressed as the mean (SEM) number of OT or VP-positive stained cells within a test-area of 11,960  $\mu$ m<sup>2</sup>. One out of every two sections was sampled throughout the nucleus and the number of positive cells was averaged among the sections. Cells were counted provided that they were inside the previously defined test-area, unless one of the 2 borderlines of the frame was superimposed over them (forbidden lines) (Mandarin-de-Lacerda, 2003).

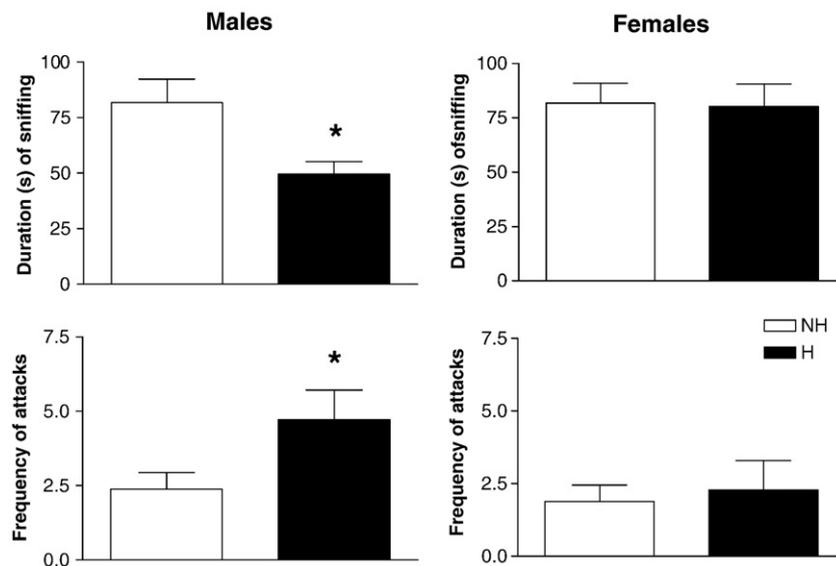
#### Statistical analysis

Data were expressed as means ( $\pm$ SEM). Comparisons were performed with same-sex animals. Results from the social memory tests and immunohistochemistry were compared between groups using one-way ANOVA with session and side of the brain, respectively, as the repeated measure. For social interaction test results, Student's *t* test was used to compare groups (NH versus H). In all cases, significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

### Social memory test

Fig. 1 illustrates the time NH and H rats spent sniffing (social investigation) a stimulus juvenile rat. Effects were detected for group [ $F_{(1,24)} = 6.60, p < 0.05$ ] and session [ $F_{(4,96)} = 8.92, p < 0.001$ ]. However, the interaction between factors did not reach significance [ $F_{(4,96)} = 0.96$ ]. Considering the main effect for session, post hoc analysis revealed that duration of sniffing the juvenile in S1 was greater than in all training sessions (S2, S3 and S4), but was not different from the test session (S5). A tendency in the main effect for group was observed among the females [ $F_{(1, 21)} = 2.72; p = 0.11$ ]. Within sessions, a main



**Fig. 2.** Effects of neonatal handling on the social interaction test in male and female adult rats. Mean ( $\pm$ SEM) of the total duration of sniffing the partner, and mean ( $\pm$ SEM) number of attacks were computed. Data were analyzed using Student's *t* test. Number of animals: NH males = 10; H males = 10; NH females = 9; H females = 7. \*Indicates significant difference compared to NH rats.

effect was detected [ $F_{(4, 84)} = 26.96, p < 0.001$ ]. No interaction between factors was detected [ $F_{(4, 84)} = 1.41$ ]. Considering the main effect for session, post hoc analysis revealed that the duration of sniffing in S1 was greater than all the other training sessions (S2, S3 and S4) and testing session (S5). However, duration in S5 was not different from S2 and was greater than S3 and S4.

#### Social interaction test

Fig. 2 illustrates the duration and frequency of social behaviors between pairs of H and NH rats. In males, handling reduced the time that the pairs spent sniffing each other [ $t_{(18)} = 3.46, p < 0.05$ ]. In females, no difference in the duration of sniffing was detected [ $t_{(15)} = 0.10$ ]. Fig. 2 also illustrates the frequency of aggressive behavior between pairs of adult rats. A marginal difference was detected among males [ $t_{(13)} = 2.11, p = 0.05$ ]; whereas no difference was detected among females [ $t_{(14)} = 0.31$ ].

#### Immunohistochemistry for OT

Fig. 3 contains photomicrographs of representative PVN slides from a male NH rat processed for OT immunohistochemistry (panel A) and VP (panel B).

Fig. 4 illustrates the number of OT-immunoreactive neurons in the PVN and SON of adult males. In the PVN, neonatal handling decreased the number of OT-parvocellular neurons [main effect for group,  $F_{(1,10)} = 7.49, p < 0.05$ ]. No significant effects were detected for side [ $F_{(1,10)} = 0.10$ ], or interaction between factors [ $F_{(1,10)} = 0.36$ ]. Fig. 4 also illustrates the number of OT-magnocellular neurons in

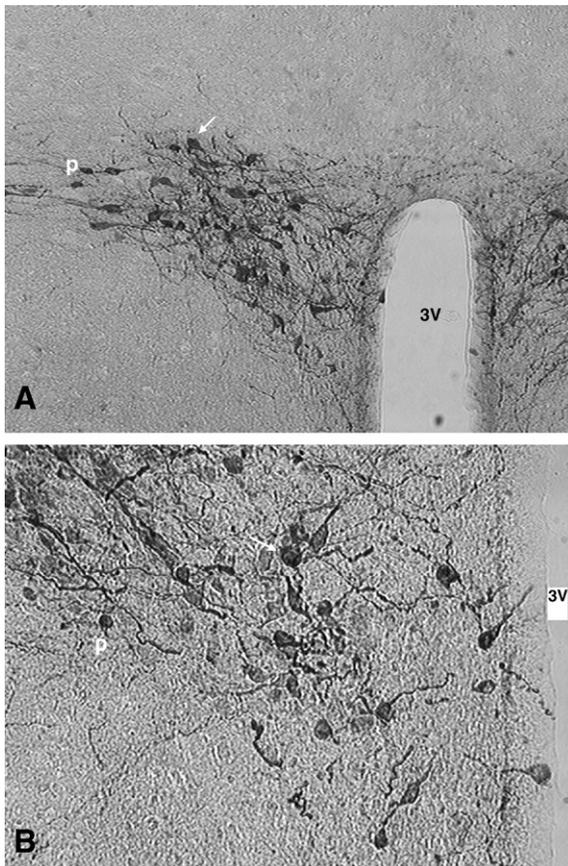


Fig. 3. Representative photomicrographs of OT-positive cells (A – low magnification view, 20 $\times$ , immunohistochemistry for OT); and VP-positive cells (B – medium magnification view, 40 $\times$ , immunohistochemistry for VP) in the PVN of male rats. P – parvocellular immunostained neuron; arrow – magnocellular immunostained neuron; 3V – third ventricle.

males. There was no change in H males compared with the NH ones [main effect for group,  $F_{(1,10)} = 1.95$ ]. No difference was detected between the sides of the brain [ $F_{(1,10)} = 0.01$ ]. Interaction between factors almost reached significance [ $F_{(1,10)} = 4.04; p = 0.07$ ].

The number of OT-neurons in the SON of adult males is also shown in Fig. 4. No significant effects were detected between H and NH males [main effect for group,  $F_{(1,10)} = 0.55$ ], side [ $F_{(1,10)} = 2.34, p = 0.15$ ], or interaction between factors [ $F_{(1,10)} = 0.21$ ].

The second group of graphs in Fig. 4 illustrates the number of OT-immunoreactive neurons in the PVN and SON of adult females. In the PVN, neonatal handling decreased the number of OT-parvocellular neurons [main effect for group,  $F_{(1,9)} = 15.18, p < 0.01$ ]. No significant effects were detected for side [ $F_{(1,9)} = 0.04$ ], or interaction between factors [ $F_{(1,9)} = 2.10, p = 0.18$ ].

The second group of graphs in Fig. 4 illustrates the number of OT-magnocellular neurons in females. There was no change H females compared with NH ones [main effect for group,  $F_{(1,9)} = 0.04$ ]. However, a significant difference was detected between the sides of the brain [ $F_{(1,9)} = 9.60, p < 0.05$ ], where there were more cells in the right side. Interaction between factors did not reach significance [ $F_{(1,9)} = 1.47$ ].

The number of OT-neurons in the SON of adult females is also shown in Fig. 4. There was no change in H females compared with NH ones [main effect for group,  $F_{(1,9)} = 0.07$ ]. The differences in the number of OT-positive cells between the sides of the SON almost reached significance [ $F_{(1,9)} = 3.67, p = 0.08$ ]. No interaction was detected between factors [ $F_{(1,9)} = 0.33$ ].

#### Immunohistochemistry for VP

Fig. 5 illustrates the number of VP-immunoreactive neurons in the PVN and SON of adult males. In the PVN, neonatal handling did not induce any change in the number of VP-parvocellular neurons [main effect for group,  $F_{(1,10)} = 0.04$ ]. Moreover, no significant effects were detected for side [ $F_{(1,10)} = 0.52$ ], or interaction between factors [ $F_{(1,10)} = 0.003$ ].

Fig. 5 also illustrates the number of VP-magnocellular neurons in the males. In the PVN, neonatal handling increased the number of VP-magnocellular neurons [main effect for group,  $F_{(1,10)} = 25.96, p < 0.001$ ]. Moreover, the number of VP-positive cells in the right PVN was higher than the left [ $F_{(1,10)} = 6.89, p < 0.05$ ]. However, interaction between factors did not reach significance [ $F_{(1,10)} = 0.21$ ].

The number of VP-neurons in the SON of the adult males is also shown in Fig. 5. No significant effects were detected for handling [main effect for group,  $F_{(1,10)} = 0.34$ ], side [ $F_{(1,10)} = 0.09$ ], or interaction between factors [ $F_{(1,10)} = 2.05$ ].

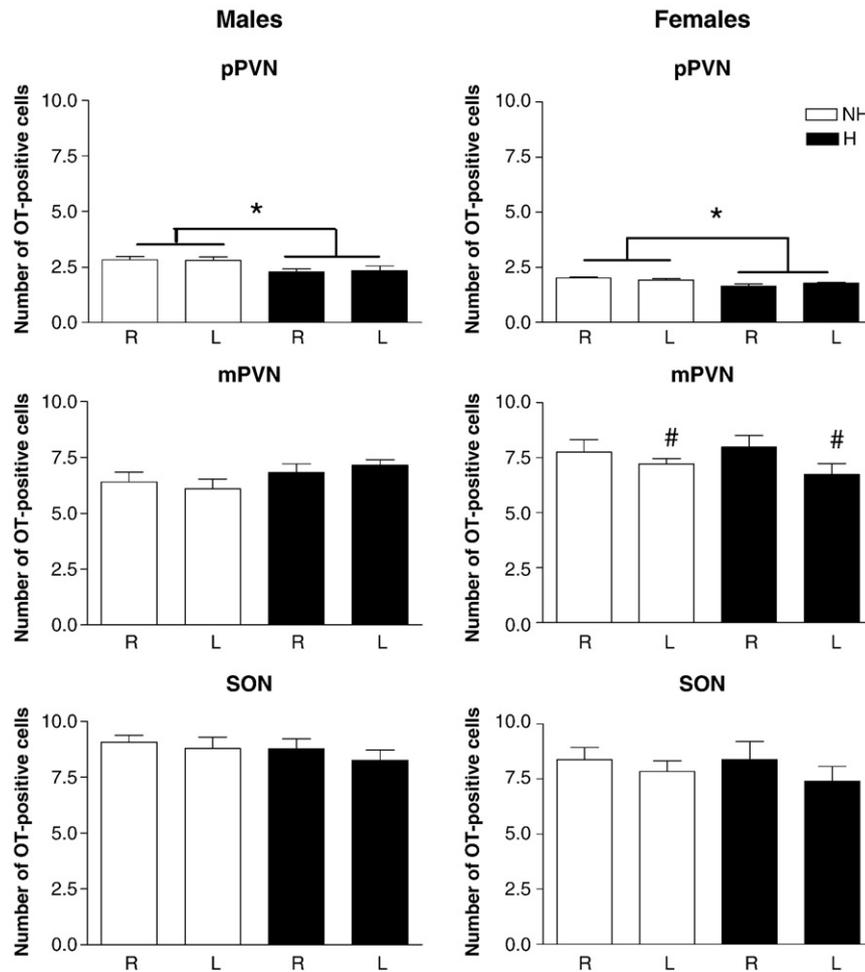
The second group of graphs in Fig. 5 illustrates the number of VP-immunoreactive parvocellular neurons in the PVN of the adult females. No significant effects were detected for handling [main effect for group,  $F_{(1,10)} = 0.01$ ], side [ $F_{(1,10)} = 0.31$ ], or interaction between factors [ $F_{(1,10)} = 0.52$ ].

Fig. 5 also illustrates the number of VP-magnocellular neurons in the PVN of females. In contrast with the males, the main effect for the group did not reach reliable significance [ $F_{(1,10)} = 3.06, p = 0.11$ ]. Moreover, no difference was detected for the sides of the brain [ $F_{(1,10)} = 1.20$ ]. Interaction between factors did not reach significance [ $F_{(1,10)} = 0.05$ ].

The number of VP-neurons in the SON of adult females is also shown in Fig. 5. No significant effects were detected for handling [main effect for group,  $F_{(1,10)} = 0.01$ ], side [ $F_{(1,10)} = 0.13$ ], or interaction between factors [ $F_{(1,10)} = 0.45$ ].

#### Discussion

The neonatal handling procedure, which involves brief and repeated separations from the dam followed by handling, reduced



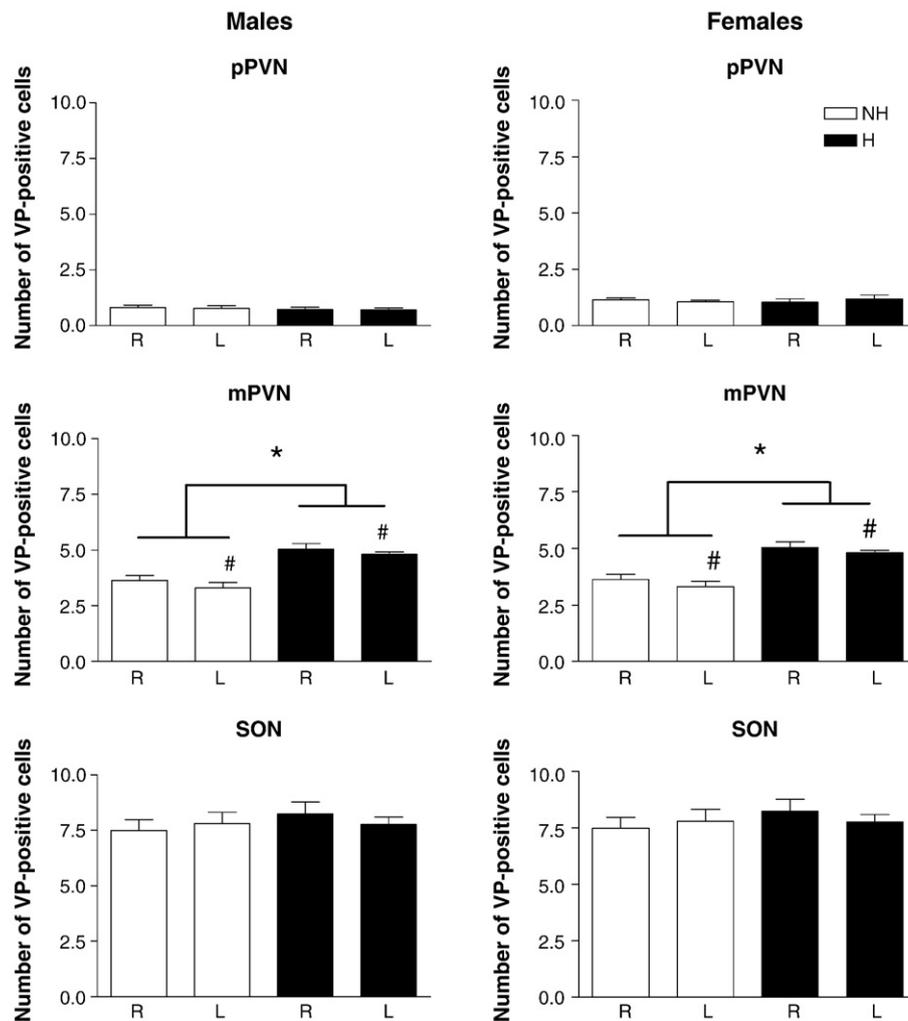
**Fig. 4.** Effects of neonatal handling on the number of positive oxytocin (OT)-immunostained cells in the right (R) and left (L) side parvocellular (pPVN) and magnocellular (mPVN) regions of the PVN and the SON in male and female rats at 90 days of age. The number of cells in the test-area ( $11,960 \mu\text{m}^2$ ) were averaged (mean  $\pm$  SEM) across the sections of the nuclei (one out of every two sections). Results were compared between groups (NH and H) and sides of the brain (right and left) with one-way ANOVA. Number of animals: NH males = 6; H males = 6; NH females = 6; H females = 5. \*Indicates significant main effect for group (NH versus H). #Indicates significant main effect for side (R versus L).

in a more affiliative strategy based on social investigation, and increased aggressive behavior in adult male rats. Recognition and memory were inferred from the social memory test, while social motivation was evaluated based on the amount of time spent in social non-aggressive contact in the social interaction test, in accordance with previous study (Lim and Young, 2006). In both tests, adult males that had been subjected to the handling procedure exhibited reduced social investigative behavior. On the other hand, social memory was not affected by the neonatal handling procedure. Notwithstanding, handled males exhibited less social interaction with the juveniles in all training and testing sessions. In a similar vein, a previous study in rodents concluded that prenatal stress leads to a decrease in social behavior during adulthood (Lee et al., 2007).

The reduction in non-aggressive social behavior does not seem to be due to increased fear. Some authors consider a reduction in social interaction to be a measure of high anxiety (Lee et al., 2007). However, increased anxiety does not seem to be the cause for the results described here. Indeed, one of the core effects of neonatal handling is a reduction in anxiety (Caldji et al., 2000; Meerlo et al., 1999; Padoin et al., 2001). Thus, it is more likely that these results can be explained as a consequence of a reduction in the capacity to form social bonding rather than of increased fear. The reduced motivation to engage in social behavior was detected in the social interaction test, in which the duration of social investigation was reduced in the H males.

Results also demonstrated an increase in aggressive behavior during the encounters between H males in the social interaction test. Assuming that aggression would be inversely related to fear, the effect of handling on aggressive behavior is compatible with the idea that the reduction in non-aggressive social interaction is not an indirect effect related to behavioral inhibition induced by increased fear/anxiety. It is therefore tempting to infer that the neonatal handling procedure may reduce the development of social behavior that facilitates pairing in male rats. Moreover, the increased aggressiveness indicates a reduced tolerance of alien conspecifics. On the other hand, the reduction in sexual behavior induced by the neonatal handling procedure shown in previous study (Padoin et al., 2001) is possibly a specific case of this reduction in social interaction that tends to bond subjects.

Handled females, on the other hand, exhibited very little difference in the time spent in social contact (sniffing) during the social memory test compared with the NH control females. Moreover, in the social interaction experiment, no difference was shown between H and NH females. Social memory was apparently not affected by the handling procedure in either males or females. Since the rats exhibited more interaction with the juvenile intruder during the testing session (S5) than during the previous encounter with the juvenile used in S1, S2, S3 and S4, we may conclude that habituation and dishabituation were observed. Indeed, previous studies have shown that the handling procedure may even improve hippocampal-dependent memory (Meaney et al., 1988; Oitzl et al., 2000; Stamatakis et al., 2008; Tang,



**Fig. 5.** Effects of neonatal handling on the number of positive vasopressin (VP)-immunostained cells in the right (R) and left (L) side parvocellular (pPVN) and magnocellular (mPVN) regions of the PVN and the SON in male and female rats at 90 days of age. The number of cells in the test-area ( $11,960 \mu\text{m}^2$ ) were averaged (mean  $\pm$  SEM) across the sections of the nuclei (one out of every two sections). Results were compared between groups (NH and H) and sides of the brain (right and left) with one-way ANOVA. Number of animals: NH males = 6; H males = 6; NH females = 6; H females = 6. \*Indicates significant main effect for group (NH versus H). #Indicates significant main effect for side (R versus L).

2001). However, the effects of neonatal handling on memory seem to depend on the test used, i.e. on the kind of memory that is being tested. Neonatal handling was shown to negatively affect inhibitory avoidance, but increase object recognition, while no difference was detected in a circular maze task (Kosten et al., 2007). We present evidence that the exposure to early life repeated handling reduces social behavior in males. At the same time, the habituation–dishabituation test indicates that neonatal handling does not affect the ability to recognize another animal of the same species. This result is in agreement with previous study in which repeated exposure to mild stress during the postnatal period did not affect social memory in adult rats (Tang et al., 2003).

Sex differences emerged in both the social memory and social interaction tests. Among the females, the neonatal handling procedure had little impact on either test in contrast with males. We did not aim to analyze the differences between male and females. However, previous studies have also shown sex differences in the changes induced by neonatal environmental interventions affecting memory (Kosten et al., 2007; Stamatakis et al., 2008), behavior, and hormones (Akers et al., 2004; Cameron et al., 2008; Padoin et al., 2001). These effects have been attributed to hormonal differences. Therefore, an interaction between the hypothalamic–pituitary–gonad hormones and the early-life environmental intervention seems evident and should be addressed directly.

The number of OT-positive cells decreased in the parvocellular region of the PVN in H males. Since central OT produced by the parvocellular neurons in the PVN has been related to social behavior and pair bonding, the reduced affiliative social behavior induced by handling could be causally related to the reduced number of OT cells in the pPVN. Besides reducing social interaction, prenatal stress decreased OT-mRNA in the PVN and increased OT receptor binding in the central amygdala in young adult male rats. Moreover, no difference was found in the expression of VP mRNA. Infusion of OT, but not VP, into the central amygdala reversed the social interaction deficit in the prenatally stressed males, showing that OT is related to social bonding (Lee et al., 2007). Here we present evidence that postnatal stress can induce a reduction in social behavior and the number of OT-positive cells in the PVN of male rats, although the environmental interventions occurred at different moments of the development.

Contradictory results have been described for the effects of early-life environmental interventions on VP. Separation from the mother for 3 h daily from day 1 to day 14 was shown to induce an increase in VP in the PVN (VP mRNA and immunoreactivity) after aggressive behavior encounters in male mice (Veenema et al., 2007) and rats (Veenema et al., 2006). On the other hand, Desbonnet et al. (2008) found a decreased number of VP-positive cells in the PVN of male rats that had been submitted to separation from the dam (3 h from

day 1 to 14). Here we present evidence that the brief separations involved in the handling procedure increased the number of VP-positive cells in the PVN of adult male rats. This result could be related to the increase of the aggressive behavior in the handled males. Indeed, previous studies (Caldwell et al., 2008; Ferris, 2008; Veenema and Neumann, 2008) have shown that VP has a facilitatory role on aggression. Neither the handling procedure (based on the results of the study described here) nor longer periods of maternal separation (based on results described by Desbonnet et al., 2008) affected the number of VP-cells in the PVN of female rats.

Besides social behaviors, the two peptides analyzed have been also related to stress responses. In contrast with VP, OT inhibits the HPA axis (Bao et al., 2008). Indeed, OT injected into the lateral ventricle of male and female rats has been shown to inhibit the HPA axis (Neumann et al., 2000); and OT-knockout male and female mice exhibited greater corticosterone response to stress (Amico et al., 2004; Mantella et al., 2004). If we assume that a decreased number of OT-parvocellular neurons is related to reduced OT secretion, then the stress-induced activity of the HPA axis would be expected to increase in the H animals, but that is not what have been described for the neonatal handled animals. In fact, a reduced stress response has been demonstrated by several laboratories (Arborelius and Enklund, 2007; Caldji et al., 2000; Levine, 1962, Levine et al., 1967; Meerlo et al., 1999). However, the neuroendocrine control of stress involves several systems and mechanisms. The apparent discrepancy (reduced stress response and number of OT cells) could be explained by the fact that handling increases the number of glucocorticoid receptors (GR) in the hippocampus, altering the feedback of the HPA axis (Meaney and Aitken, 1985). The improved stress feedback would be the main consequence of handling on the response of corticosterone to stressors. Nevertheless, this inference has yet to be confirmed experimentally.

On the other hand, the increased number of VP-magnocellular neurons in males does not appear to contradict the well-known effect of neonatal handling reducing stress responses (Liu et al., 1997; Meerlo et al., 1999; Plotsky and Meaney, 1993). However, within the PVN, the neurons that stimulate the corticotrophs are the parvocellular ones (Dinan and Scott, 2005; Ruscio et al., 2007; Treschan and Peters, 2006), and results showed no change in the number of VP-parvocellular neurons in the PVN in H rats.

Results also showed that the number of VP-positive magnocellular neurons on the right side of the PVN in the males was greater than on the left side; while in females, we observed a greater number of OT-magnocellular neurons in the right side of the PVN. Neonatal handling did not affect these lateral distributions in either case. To our knowledge this is the first time that lateralization of these peptidergic neurons has been shown in rats. Previous studies have demonstrated right asymmetry for GnRH (Gerendai and Halasz, 2001) and dopaminergic neurons (Sullivan and Dufresne, 2006) in the hypothalamus of rats. Nevertheless, neonatal handling did not interact with the lateralization of VP or OT cells in males and females, respectively.

In conclusion, repeated brief separations from the mother followed by handling during the neonatal period induced a reduction in affiliative social behavior among adult males, but not females. At the same time, an increase in aggressive behavior between H males during the social interaction test was detected. These behaviors have been related to central OT and VP. Indeed, neonatal handling reduced the number of OT-parvocellular neurons in both male and female rats, and increased the number of VP-magnocellular neurons in the PVN of males, but not of females. These results suggest that the disruption to the mother–infant relationship caused by the handling procedure may induce long-lasting morphological changes in critical neuroendocrine areas that are involved in social bonding in mammals.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Hal Gainer (NIH, Bethesda, USA) for the generous gift of the antibodies and Maria Angela Silva dos Santos for technical assistance. FAPESP, CNPq and CAPES supported this research.

## References

- Akers, K.G., Reeba, B.C., Tang, A.C., 2004. Developmentally stable sex-dependent modulation of turning asymmetry by neonatal novelty exposure. *Behav. Brain Res.* 155, 257–263.
- Amico, J.A., Mantella, R.C., Volmer, R.R., Li, X., 2004. Anxiety and stress responses in female oxytocin deficient mice. *J. Neuroendocrinol.* 16, 319–324.
- Arborelius, L., Enklund, M.B., 2007. Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle aged female rats. *Neuroscience* 145, 738–750.
- Bales, K.L., Plotsky, P.M., Young, L.J., Lim, M.M., Grotte, N., Ferrer, E., Carter, C.S., 2007. Neonatal oxytocin manipulations have long-lasting, sexually dimorphic effects on vasopressin receptors. *Neuroscience* 144, 38–45.
- Bao, A.M., Meynen, G., Swaab, D.F., 2008. The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res. Rev.* 57, 531–553.
- Ben-Barak, Y., Russell, J.T., Whitnall, M.H., Ozato, K., Gainer, H., 1985. Neurophysin in the hypothalamo–neurohypophysial system. I. Production and characterization of monoclonal antibodies. *J. Neurosci.* 5, 81–97.
- Bielsky, I.F., Young, L.J., 2004. Oxytocin, vasopressin and social recognition in mammals. *Peptides* 25, 156–174.
- Caldji, C., Francis, D., Sharma, S., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 2000. The effects of early rearing environment on the development of GABA<sub>A</sub> and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology* 22, 219–229.
- Caldwell, H.K., Wersinger, S.R., Young III, W.S., 2008. The role of the vasopressin 1b receptor in aggression and other social behaviours. *Prog. Brain Res.* 170, 65–72.
- Cameron, N., Del Corpo, A., Diorio, J., McAllister, K., Sharma, S., Meaney, M.J., 2008. Maternal programming of sexual behavior and hypothalamic–pituitary–gonadal function in the female rat. *PLoS ONE* 3 (5), e2210.
- Cushing, B.S., Kramer, K.M., 2005. Mechanisms underlying epigenetic effects of early social experience: the role of neuropeptides and steroids. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1089–1105.
- Denenberg, V.H., 1964. Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity: a theory of infantile stimulation. *Psychological Rev.* 71, 335–351.
- Desbonnet, L., Garrett, L., Daly, E., McDermott, K.W., Dinan, T.G., 2008. Sexually dimorphic effects of maternal separation stress on corticotrophin-releasing factor and vasopressin systems in the adult rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 26, 259–268.
- Dinan, T.G., Scott, L.V., 2005. Anatomy of melancholia: focus on hypothalamic–pituitary–adrenal axis overactivity and the role of vasopressin. *J. Anat.* 207, 259–264.
- Engelmann, M., Wotjak, C.T., Ebner, K., Landgraf, R., 2000. Behavioural impact of intrasexually released vasopressin and oxytocin in rats. *Exp. Physiol.* 85, 1255–1305.
- Fenoglio, K.A., Brunson, K.L., Baram, T.Z., 2006a. Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: functional and molecular aspects. *Front. Neuroendocrinol.* 27, 180–192.
- Fenoglio, K.A., Chen, Y., Baram, T.Z., 2006b. Neuroplasticity of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis early in life requires recurrent recruitment of stress-regulating brain regions. *J. Neurosci.* 26, 2434–2442.
- Ferris, C.F., 2008. Functional magnetic resonance imaging and the neurobiology of vasopressin and oxytocin. *Prog. Brain Res.* 170, 305–320.
- Fries, A.B.W., Ziegler, T.E., Kurian, J.R., Jacoris, S., Pollak, S.D., 2005. Early experience in humans is associated with changes in neuropeptides critical for regulation of social behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17237–17240.
- Gerendai, I., Halasz, B., 2001. Asymmetry of the neuroendocrine system. *News Physiol. Sci.* 16, 92–95.
- Gomes, C.M., Raineki, C., Ramos de Paula, P., Severino, G.S., Helena, C.V., Anselmo-Fanci, J.A., Franci, C.R., Sanvitto, G.L., Lucion, A.B., 2005. Neonatal handling and reproductive function in female rats. *J. Endocrinol.* 184, 435–445.
- Hammock, E.A., Young, L.J., 2006. Oxytocin, vasopressin and pair bonding: implications for autism. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.* 361 (1476), 2187–2198.
- Heim, C., Plotsky, P.M., Nemeroff, C.B., 2004. Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. *Neuropsychopharmacology* 29, 641–648.
- Heim, C., Newport, D.J., Mletzko, T., Miller, A.H., Nemeroff, C.B., 2008. The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology* 33, 693–710.
- Kaffman, A., Meaney, M.J., 2007. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. *J. Child Psychol. Psychiatry* 48, 224–244.
- Keever, E.B., Curley, J.P., 2004. Vasopressin, oxytocin and social behaviour. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 777–783.
- Kosten, T.A., Lee, H.J., Kim, J.J., 2007. Neonatal handling alters learning in adult male and female rats in a task-specific manner. *Brain Res.* 1154, 144–153.
- Kramer, K.M., Choe, C., Carter, C.S., Cushing, B.S., 2006. Developmental effects of oxytocin on neural activation and neuropeptide release in response to social stimuli. *Horm. Behav.* 49, 206–214.

- Ladd, C.O., Thiruvikraman, K.V., Huot, R.L., Plotsky, P.M., 2005. Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling–maternal separation as neonates. *Psychoneuroendocrinology* 30, 520–533.
- Lee, R., Brady, D.L., Shapiro, R.A., Dorsa, D.M., Koenig, J.I., 2007. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: reversal by oxytocin. *Brain Res.* 1156, 152–167.
- Levine, S., 1962. Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science* 135, 795–799.
- Levine, S., Haltmeyer, G.C., Karas, G.G., Denenberg, V.H., 1967. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol. Behav.* 2, 55–59.
- Lim, M., Young, L.J., 2006. Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. *Horm. Behav.* 50, 506–517.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic–pituitary–adrenal responses to stress. *Science* 277 (5332), 1659–1662.
- Lucion, A.B., Pereira, F.M., Winkelmann, E.C., Sanvitto, G.L., Anselmo-Franci, J.A., 2003. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behav. Neurosci.* 117, 894–903.
- Ludwig, M., Leng, G., 2006. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 126–136.
- Mandarim-de-Lacerda, C.A., 2003. Stereological tools in biomedical research. *Ann. Acad. Bras. Cienc.* 75, 469–486.
- Mantella, R.C., Vollmer, R.R., Rinaman, L., Li, X., Amico, J.A., 2004. Enhanced corticosterone concentrations and attenuated Fos expression in the medial amygdala of female oxytocin knockout mice exposed to psychogenic stress. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R1494–R1504.
- Meaney, M.J., Aitken, D.H., 1985. The effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations: temporal parameters. *Dev. Brain Res.* 22, 301–304.
- Meaney, M.J., Aitken, D.H., van Berkel, C., Bhatnagar, S., Sapolsky, R.M., 1988. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science* 239, 766–768.
- Meerlo, P., Horvath, K.M., Nagy, G.M., Bohus, B., Koolhaas, J.M., 1999. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J. Neuroendocrinol.* 11, 925–933.
- Neumann, I.D., Wigger, A., Torner, L., Holsboer, F., Landgraf, R., 2000. Brain oxytocin inhibits basal and stress-induced activity of the hypothalamo–pituitary–adrenal axis in male and female rats: partial action within the paraventricular nucleus. *J. Neuroendocrinol.* 12, 235–243.
- Oitzl, M.S., Workel, J.O., Fluttert, M., Frosch, F., De Kloet, E.R., 2000. Maternal deprivation affects behavior from youth to senescence: amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescent brown Norway rats. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3771–3780.
- Padoin, M.J., Cadore, L.P., Gomes, C.M., Barros, H.T.M., Lucion, A.B., 2001. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav. Neurosci.* 115, 1332–1340.
- Patin, V., Lordi, B., Vincent, A., Caston, J., 2005. Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. *Dev. Brain Res.* 160, 265–274.
- Pedersen, C.A., Boccia, M.L., 2002. Oxytocin maintains as well as initiates female sexual behavior: effects of a highly selective oxytocin antagonist. *Horm. Behav.* 41, 170–177.
- Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1993. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Mol. Brain Res.* 18, 195–200.
- Pryce, C.R., Bettschen, D., Nanz-Bahr, N.I., Feldon, J., 2003. Effects of manipulations of the rat pup–dam relationship on affective learning and memory in adulthood. *Behav. Neurosci.* 117, 883–893.
- Raineki, C., Szawka, R.E., Gomes, C.M., Lucion, M.K., Barp, J., Belló-Klein, A., Franci, C.R., Anselmo-Franci, J.A., 2008. Effects of neonatal handling on central noradrenergic and nitric oxidergic systems and reproductive parameters in female rats. *Neuroendocrinology* 87, 151–159.
- Rasband, W., 1996. NIH Image [Computer software]. Retrieved May 2002, from <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/download.html>.
- Ruscio, M.G., Sweeny, T., Hazelton, J., Suppatkul, P., Carter, C.S., 2007. Social environment regulates corticotropin releasing factor, corticosterone and vasopressin in juvenile prairie voles. *Horm. Behav.* 51, 54–61.
- Sanchez, M., Ladd, C., Plotsky, P., 2001. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. *Dev. Psychopathol.* 13, 419–449.
- Severino, G.S., Fossati, I.A., Padoin, M.J., Gomes, C.M., Trevizan, L., Sanvitto, G.L., Franci, C.R., Anselmo-Franci, J.A., Lucion, A.B., 2004. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiol. Behav.* 81, 489–498.
- Stamatakis, A., Pondiki, S., Kitraki, E., Diamantopoulou, A., Panagiotaropoulos, T., Raftogianni, A., Stylianopoulou, F., 2008. Effect of neonatal handling on adult rat spatial learning and memory following acute stress. *Stress* 11, 148–159.
- Sullivan, R.M., Dufresne, M.M., 2006. Mesocortical dopamine and HPA axis regulation: role of laterality and early environment. *Brain Res.* 1076, 49–59.
- Swain, J.E., Lorberbaum, J.P., Kose, S., Strathearn, L., 2007. Brain basis of early parent–infant interactions: psychology, physiology, and in vivo functional neuroimaging studies. *J. Child Psych. Psychiatry* 48, 262–287.
- Tang, A.C., 2001. Neonatal exposure to novel environment enhances hippocampal-dependent memory function during infancy and adulthood. *Learn. Mem.* 8, 257–264.
- Tang, A.C., Reeb, B.C., Romeo, R.D., McEwen, B.S., 2003. Modification of social memory, hypothalamic–pituitary–adrenal axis, and brain asymmetry by neonatal novelty exposure. *J. Neurosci.* 23, 8254–8260.
- Treschan, T.A., Peters, J., 2006. The vasopressin system: physiology and clinical strategies. *Anesthesiology* 105, 599–612.
- Veenema, A.H., Neumann, I.D., 2008. Central vasopressin and oxytocin release: regulation of complex social behaviours. *Prog. Brain Res.* 170, 261–276.
- Veenema, A.H., Blume, A., Niederle, D., Buwalda, B., Neumann, I.D., 2006. Effects of early life stress on adult male aggression and hypothalamic vasopressin and serotonin. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1711–1720.
- Veenema, A.H., Bredewold, R., Neumann, I.D., 2007. Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology* 32, 437–450.
- Wersinger, S.R., Kelliher, K.R., Zufall, F., Lolait, S.J., O'Carroll, A.M., Young, W.S., 2004. Social motivation is reduced in vasopressin 1b receptor null mice despite normal performance in an olfactory discrimination task. *Horm. Behav.* 46, 638–645.
- Winkelmann-Duarte, E.C., Todeschin, A.S., Fernandes, M.C., Bittencourt, L.C., Pereira, G.A.M., Samios, V.N., Schuh, A.F.S., Achaval, M.E., Xavier, L.L., Sanvitto, G.L., Lucion, A.B., 2007. Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. *Brain Res.* 1170, 20–30.
- Winslow, J.T., Camacho, F., 1995. Cholinergic modulation of a decrement in social investigation following repeated contacts between mice. *Psychopharmacology* 121, 164–172.
- Young, L.J., Wang, Z., 2004. The neurobiology of pair bonding. *Nat. Neurosci.* 7, 1048–1054.