



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

**ESTRESSE PRÉ-NATAL E SUAS REPERCUSSÕES
SOBRE O CUIDADO MATERNAL E COMPORTAMENTO
DE RATOS A CURTO E A LONGO PRAZO**

TESE DE DOUTORADO

MARCELO ALVES DE SOUZA

Porto Alegre

2012



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

**ESTRESSE PRÉ-NATAL E SUAS REPERCUSSÕES
SOBRE O CUIDADO MATERNAL E COMPORTAMENTO
DE RATOS A CURTO E A LONGO PRAZO**

MARCELO ALVES DE SOUZA

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Porto Alegre

2012

CIP - Catalogação na Publicação

De Souza, Marcelo Alves
Estresse pré-natal e suas repercussões sobre o
cuidado maternal e comportamento de ratos a curto e
a longo prazo / Marcelo Alves De Souza. -- 2012.
107 f.

Orientador: Aldo Bolten Lucion.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas
da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS,
2012.

1. Estresse Pré-natal. 2. Comportamento Maternal.
3. Preferência ao odor do ninho. 4. Comportamento
Social. 5. Ocitocina e Vasopressina. I. Lucion, Aldo
Bolten, orient. II. Título.

“Aos meus pais, que sempre me apoiaram”

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, *Ercy* e *Maria*, que mesmo a distância, sempre me ouviram, apoiaram e acreditaram no meu esforço a cada dia desde o início.

A *Lígia*, por ser minha companheira, parceira, amiga e meu amor. Por toda a ajuda e paciência que teve comigo durante esses anos. Te admiro muito pelo seu profissionalismo e competência e te amo demais. Obrigado por compartilhar comigo todas as coisas que temos em comum e por todas aquelas que nos diferenciam também.

Às minhas irmãs, *Eliane*, *Elizângela*, *Elaine* e também aos meus cunhados *Ilário* e *Sídney* pelas estadias, caronas e conselhos durante os preciosos períodos de convivência.

Ao professor *Aldo Bolten Lucion*, pela confiança, serenidade e sabedoria, pelas horas de trabalho destinadas a discussões dos resultados, pelos jantares em sua casa e principalmente por acreditar no meu trabalho.

Ao meu amigo e irmão *Fernando*, pela amizade e pelos momentos bons e ruins que dividimos juntos durante os seis anos que convivemos. Tenha certeza que aprendi muito contigo.

Em especial, agradeço aos meus colegas *Thiago Henriques*, *Ana Raquel*, *Luisa Diehl*, *Jéferson Ferraz* e *Regis Gemerasca*, pelo apoio técnico nos experimentos e por terem se tornado meus verdadeiros amigos.

Aos demais colegas do laboratório, *Amanda, Adolfo, Marcinha, Cláudio Felipe, Silvana, Simone, Bruno, Pâmela e Renata*. Obrigado pela convivência durante os anos que passei no doutorado.

À *prof^a. Matilde Achaval*, por ter me cobrado somente pão de queijo em troca do espaço cedido em seu o laboratório e também por me chamar carinhosamente de “mineirito aproveitador”.

Ao *prof. Gilberto Sanvito*, por tantas dúvidas esclarecidas e discussões proveitosas durante a execução dos experimentos.

A todos os *professores do PPG-Fisiologia* pela assistência e incentivo. Aos queridos funcionários, *Alice e Kelly*, pelo apoio e auxílio, que sempre facilitaram a resolução dos problemas.

Aos funcionários do biotério, *Dona Geni, Ricardo e Paula*, pelo comprometimento e cuidado com os animais.

Ao *CNPq*, pela bolsa de estudos, a qual foi fundamental para realização desse trabalho e á *FAPESP* pelo apoio na realização dos experimentos.

A todos vocês, muito obrigado por tudo!

“Aquilo que pensamos saber, com frequência nos impede de aprender”.

Claude Bernard

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO.....	133
1.1 Estresse gestacional	144
1.2 Comportamento maternal.....	166
1.3 Preferencia ao odor materno	177
1.3 Papel da noradrenalina na preferência ao odor materno	188
1.4 Comportamentos sociais	199
1.4.1. Interação social	199
1.4.2. Memória Social	20
1.4.3. Ocitocina e vasopressina	222
2. JUSTIFICATIVA	255
3. OBJETIVO	277
3.1 Objetivo Geral.....	288
3.2 Objetivos Específicos	289
4. MATERIAIS E MÉTODOS 1º ARTIGO	3030
5. MATERIAIS E MÉTODOS 2º ARTIGO	366
6. RESULTADOS	433
Artigo I.....	444
Artigo II	511
7. DISCUSSÃO GERAL.....	844
8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	899
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	933

LISTA DE FIGURAS

Figura I. Via noradrenérgica do LC para o BO.	19
Figura II. Representação esquemática do procedimento de adoção.....	32
Figura III. Teste de memória social.....	38
Figura IV. A utilizado para o teste de interação social.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA** - Análise de Variância
- APOM** - Área pré-optica medial
- 6-OHDA** - 6-hidroxidopamina
- ADH** - Hormônio Anti-diurético
- BO** - Bulbo Olfatório
- BSA** - Albumina de Soro Bovino
- DHBA** - 3,4-hidrobrometo de diidroxibenzilamina
- DAB** - Diaminobenzidina
- DA** - Dopamina
- EDTA** - Ácido etilenodiamino-tetraacético
- HPLC-ED** - Cromatografia líquida de alta pressão com detecção eletroquímica
- LC** - Locus coeruleus
- MCID** - Dispositivo de análise e imagem
- MHPG** - 3-Metoxi-4-Hidroxi fenil etilenoglicol
- NA** - Noradrenalina
- OT** - Ocitocina
- PBS** - Tampão Fosfato Salino
- PVN** - Núcleo Paraventricular
- 5-HT** - Serotonina
- SNC** - Sistema Nervoso Central
- VP** - Vasopressina

RESUMO

Em humanos e roedores, o estresse durante a gestação produz nos filhotes aumento dos níveis de ansiedade, prejuízos no aprendizado e memória, alterações no cuidado materno e déficits nos comportamentos sociais. A maioria dos protocolos de estresse pré-natal atribui seus resultados à vulnerabilidade do período intra-uterino. Todavia, estudos mostram que as conseqüências causadas por essa intervenção advêm de um efeito indireto sobre o comportamento materno. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi analisar as repercussões do estresse por contenção aplicado durante a última semana de gestação sobre: (1) o cuidado maternal; (2) comportamento de preferência ao odor do ninho e conteúdo de NA no bulbo olfatório (BO) dos filhotes; e, por fim, (3) sobre os comportamentos sociais e número de neurônios positivos para ocitocina (OT) e vasopressina (VP) nos núcleos paraventricular (PVN) e supra-óptico (SON) de filhotes adultos. Dois artigos científicos foram produzidos a partir dos resultados obtidos. No primeiro deles, intitulado *“Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference”*, o estresse pré-natal reduziu o comportamento materno e extinguiu a preferência ao odor do ninho em filhotes machos e fêmeas quando, ambos os eventos, estresse pré-natal e redução no cuidado maternal foram combinados. Nesse contexto, filhotes fêmeas mostraram-se mais vulneráveis as intervenções perinatais em comparação aos filhotes machos. Entretanto, não foram observadas alterações na atividade noradrenérgica no BO desses animais. Os resultados do segundo estudo intitulado *“Prenatal stress produces social behavior deficits and alters the number of oxytocin and vasopressin neurons in adult rats”*, mostraram que a combinação do estresse pré-natal realizado nas mães e também nos filhotes resultou em déficits ligados a ansiedade, agressividade e comportamentos sociais. Além disso, o número de células ocitocinérgicas e vasopressinérgicas no PVN se mostraram alteradas nesses animais. Todavia, os déficits comportamentais foram mais relacionados a disfunções do sistema vasopressinérgico do que ocitocinérgico.

ABSTRACT

In humans and rodents, stress during pregnancy has produced offspring with high levels of anxiety, impaired learning and memory, changes in maternal care and social behavior deficits. Most prenatal stress protocols have attributed their results to the vulnerability of the intrauterine period. However, studies show that the consequences caused by this action arise from an indirect effect on maternal behavior. In this context, the objective of this study was to analyze the impact of restraint stress applied during the last week of pregnancy on: (1) maternal care; (2) nest odor preference behavior and NA content in the olfactory bulb (OB) of rat pups, and, finally, (3) on the social behaviors and number of neurons positive for oxytocin (OT) and vasopressin (VP) in the paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON) of adult rats. Thus, based on the results obtained, two studies were produced. The first study, titled “*Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference*”, found that prenatal stress reduced maternal behavior and extinguished nest odor preference in male and female pups when both events, prenatal stress and reduced maternal care, were combined. In this test, female pups were more found to be more vulnerable to perinatal interventions compared to male pups. On the other hand, no changes were observed in the noradrenergic OB in these animals. The results of the second study, titled “*Prenatal stress produces social behavior deficits and alters the number of oxytocin and vasopressin neurons in adult rats*”, found that the combination of prenatal stress applied to mothers and also to their offspring, resulted in deficits linked to anxiety, aggression and social behaviors. Furthermore, in these animals, the number of vasopressinergic and oxytocinergic cells in the PVN was seen to be altered. However, the behavioral deficits were more related to malfunctions in the vasopressinergic system than in the oxytocinergic system.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estresse gestacional

Em humanos, experiências estressoras durante o período pré-natal ou em períodos próximos ao parto aumentam nos filhos a vulnerabilidade a diversas psicopatologias na idade adulta (KOFMAN, 2002). Crianças e adolescentes, filhos de mulheres que vivenciaram eventos estressores durante esse período são mais propensos a apresentar problemas emocionais, baixo rendimento escolar, hiperatividade e déficits de atenção (GLOVER et al., 2004; BEVERSDORF et al., 2005; GUTTELING et al., 2006; TALGE et al., 2007).

Devido às dificuldades inerentes à realização de pesquisas envolvendo humanos, os efeitos do estresse pré-natal têm sido mais extensivamente estudados em modelos animais. Diversos protocolos de estresse durante esse período têm sido aplicados em roedores com o objetivo de recriar alguns de muitos distúrbios já mencionados. Os mais comumente utilizados incluem, o estresse variado não previsível (KINNUNEM et al., 2003; KOENING et al., 2005), estresse com predador natural (PATIN et al., 2002; PATIN et al., 2004) e o estresse por contenção (SMITH et al., 2004; CHAMPAGNE E MEANEY, 2006; MACCARI E MORLEY-FLETCHER, 2007). O estresse variado não previsível baseia-se na exposição da fêmea prenha a diferentes estímulos estressores durante horários imprevisíveis, como por exemplo, exposição ao frio, calor, nado forçado e choque. O estresse por predador é caracterizado pela exposição da prenha ao seu predador natural. Por fim, o estresse por contenção é caracterizado pela restrição de movimentos da rata prenha quando a mesma é colocada em um contensor.

Os efeitos do estresse durante o período gestacional nos filhotes têm sido mais extensivamente investigados usando o modelo de contenção, o qual tem demonstrado alterações mais salientes quando comparado a outros protocolos (RICHARDSON et al.,

2006). Estudos prévios mostram que essa intervenção diminui a memória espacial em filhotes no labirinto aquático de Morris (YAKA et al., 2007), altera o comportamento sexual (GERARDIM et al., 2005), aumenta o comportamento defensivo e agressivo (DICKERSON et al., 2005), aumenta os comportamentos ligados a ansiedade (VALLEE et al., 1997; ESTANISLAU & MORATO, 2005) e depressão (YANG et al., 2006; ABE et al., 2007), e causa déficits nos comportamentos sociais (PATIN et al., 2005; LEE et al., 2007).

Eventos estressores vivenciados por mulheres durante a gravidez também têm sido associados ao abuso e a negligência infantil (BRAYDEN et al., 1992; MAUGHAN & MCCARTHY, 1997). Similarmente, ratas prenhas quando são submetidas a intervenções durante o período pré-natal mostram prejuízos nos comportamentos maternos (SMITH et al., 2004; CHAMPAGNE & MEANEY, 2006; BOSCH et al., 2007b). Estudos apontam ainda que os possíveis responsáveis pelos danos comportamentais observados em filhotes de fêmeas submetidas ao estresse pré-natal são o estresse pré-natal e também o ambiente pós-natal alterado (DEL CERRO et al., 2010; DE SOUZA et al., 2011).

Postula-se que durante o período gestacional uma quantidade excessiva de glicocorticóides alcança o feto durante a exposição ao estresse pré-natal e provoque alterações nos processos de diferenciação, migração e maturação neuronal (DARNAUDERY & MACCARI, 2008a). O estresse aplicado durante o período pré-natal também pode levar a uma diminuição da atividade da enzima 11 β -diidroxisteroide desidrogenase 2 (11 β -HSD2). Tal enzima está presente na placenta e metaboliza a forma ativa dos glicocorticóides em sua forma inativa (MAIRESSE et al., 2007). De acordo com essa hipótese, alguns dos prejuízos comportamentais produzidos pelo estresse pré-natal podem ser prevenidos quando a secreção desse hormônio é

suprimida pela adrenalectomia de fêmeas prenhas (DARNAUDERY & MACCARI, 2008b).

1.2 Comportamento maternal

Visando receber adequadamente os filhotes, no final da gestação a mãe inicia uma sequência de mudanças comportamentais. Ela muda seus padrões de limpeza corporal, levando mais tempo na região mamária, e dias antes do parto a fêmea constrói um ninho para acomodar os filhotes (TODESCHINI, 2002). O declínio dos níveis de progesterona e o aumento da concentração de estradiol e prolactina durante essa fase são citados como os responsáveis pela rápida responsividade aos filhotes durante o período pós-natal (NEMSADZE & SILAGAVA, 2010). Todavia, os mecanismos e as estruturas encefálicas influenciadas pela ação desses hormônios ainda permanecem desconhecidos.

Assim como a maior parte dos roedores, filhotes de ratos nascem altriciais, ou seja, são desprovidos de pêlos, respondem pouco aos estímulos sonoros, visuais, não possuem atividade locomotora e não regulam sua própria temperatura. Devido a esse estado precoce de desenvolvimento, eles dependem integralmente de sua mãe para sobrevivência (PRYCE & FELDON, 2003). O cuidado materno por sua vez, é mantido pela lactante através de estímulos visuais, olfatórios e auditivos dirigidos à ninhada (PRYCE & FELDON, 2003; PEREIRA & MORRELL, 2011).

Após o nascimento da ninhada, a rata lactante mantém uma série de comportamentos dirigidos aos filhotes. Muitos desses cuidados originam-se a partir de estímulos provenientes dos próprios filhotes (FLEMING et al., 1999). Os principais cuidados fornecidos pelas mães durante esse período incluem: (1) a amamentação, na qual a mãe passa a maior parte do tempo em postura arqueada para que a sua região

mamária fique mais exposta; (2) Comportamento de construção de ninho, que garante proteção aos filhotes e regulação da temperatura corporal na ausência da mãe; (3) Comportamento de recolhimento dos filhotes, que tem a função de transporte e (4) as lambidas, que estimulam a defecação e a secreção urinária dos filhotes, além de ter a função de limpeza (NUMAN & STOLZENBERG, 2009).

Variações no cuidado materno, em especial no número de lambidas e limpeza dos filhotes (*licking/grooming*) são críticas durante o desenvolvimento de roedores (CHAMPAGNE et al., 2003). Tal comportamento é um importante estímulo tátil, relacionado com o aparecimento de respostas endócrinas, emocionais e cognitivas frente ao estresse (CALDIJI et al., 2000; CHAMPAGNE et al., 2003). Além disso, alterações no comportamento materno podem levar a um comprometimento de comportamentos futuros, pois fêmeas que receberam maior quantidade de lambidas no período neonatal também passaram mais tempo com seus filhotes quando se tornaram mães (FRANCIS et al., 1999; CHAMPAGNE, 2011).

Estudos mostram que a separação materna, isolamento social e estresse gestacional são intervenções que diminuem efetivamente o contato mãe-filhote (BOCCIA & PERDERSEN, 2001; CHAMPAGNE et al., 2003; CHAMPAGNE & MEANEY, 2006; CHAMPAGNE, 2011). Além disso, a criação artificial de filhotes de ratos na ausência da mãe produz déficits de atenção, hiperatividade e prejuízos nos comportamentos sociais (LEVY et al., 2003; LOVIC & FLEMING, 2004).

1.3 Preferência ao odor materno

Em roedores, o olfato atua de maneira crítica na identificação da mãe pelo filhote durante a primeira semana de vida. Tal reconhecimento é chamado de aprendizado olfatório (SULLIVAN et al., 1989; LEON, 1998; MORICEAU et al.,

2009), o qual ocorre naturalmente através de um paradigma de condicionamento clássico, onde o cuidado maternal (estímulo incondicionado) é associado ao cheiro da mãe (estímulo condicionado) (SULLIVAN et al., 1991b; SULLIVAN & WILSON, 2003; RAINEKI et al., 2010). Em um paradigma experimental, o pareamento da estimulação tátil de filhotes através de um pincel (mimetizando as lambidas da mãe) com um novo odor, leva os animais a terem preferência por esse novo cheiro (SULLIVAN et al., 1991a). Da mesma forma que as lambidas da mãe, a estimulação tátil do filhote utilizando um pincel produz um aumento da atividade elétrica do *locus ceruleus* (LC) (NAKAMURA et al., 1987). Esse núcleo libera grandes quantidades de noradrenalina (NA) em diversas regiões encefálicas durante o 1º até o 9º dia de vida pós-natal (SULLIVAN, 2003) (Figura I). Acredita-se que mudanças no amadurecimento do LC provocadas pelo surgimento de auto-receptores adrenérgicos a partir do 9º dia, influenciem o padrão de funcionalidade dessa estrutura determinando a preferência por um novo odor (SULLIVAN, 2003; MORICEAU & SULLIVAN, 2005).

1.3 Papel da noradrenalina na preferência ao odor materno

A NA exerce uma ampla variedade de funções sobre a fisiologia animal. Esse neurotransmissor está envolvido na regulação do ciclo do sono-vigília, comportamento alimentar, agressividade, humor e modulação dos processos relacionados à formação da memória e aprendizado (GIBBS & SUMMERS, 2004).

A NA atua sobre nove diferentes subtipos de receptores expressos em astrócitos, células gliais e endoteliais. Esses adreno-receptores são classificados em três subclasses: α -1, α -2 e os β receptores (GIBBS & SUMMERS, 2004; NAI et al., 2010). Em ratos durante o período neonatal, os receptores adrenérgicos do tipo α -1 e β -1 já estão

funcionais no bulbo olfatório (BO) (MCLEAN & SHIPLEY, 1991). Em resposta a liberação de NA do LC, essa região encefálica atua de maneira a manter respostas prolongadas em suas células mitrais necessárias para a aquisição da preferência ao odor (SULLIVAN & WILSON, 2003). Desse modo, esse neurotransmissor tem um importante papel na indução do aprendizado e na plasticidade neural durante o desenvolvimento neonatal (MCLEAN et al., 1999; YUAN et al., 2003; PANDIPATI et al., 2010).

Lesões bilaterais do LC em ratos neonatos utilizando 6-OHDA reduzem o conteúdo de NA no BO e impedem que esses animais aprendam a ter preferência por um determinado odor (SULLIVAN & WILSON, 1994). Assim, a liberação de NA no BO por meio da projeção do LC é muito importante para a formação do vínculo mãe-filhote nos primeiros dias de vida.

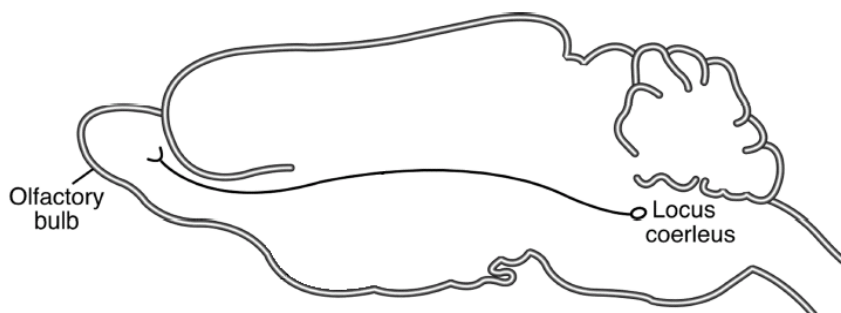


Figura I. Via noradrenérgica do LC para o BO. Para que o aprendizado olfatório ocorra, é necessário o pareamento de um odor com a liberação de NA proveniente do LC (Modificado de Sullivan 2003).

1.4 Comportamentos sociais

1.4.1. Interação social

Em humanos, a quantidade e a qualidade dos cuidados recebidos durante o período pós-natal podem influenciar na expressão de comportamentos como a agressividade, preferência por substâncias que causam dependência e também no estabelecimento de vínculos sociais na idade adulta (PERDERSEN, 2004).

Entende-se por interação social a aproximação e o compartilhamento de um mesmo ambiente por dois ou mais indivíduos. A motivação para que animais se mantenham em um mesmo espaço baseia-se nas vantagens que esse comportamento traz como, por exemplo, a de garantir proteção, alimentação e reprodução, facilitando a sua sobrevivência (CARTER & KEVERNE, 2002).

Na maioria dos mamíferos, a ocorrência dos comportamentos sociais aparece com mais frequência durante o período da adolescência (VARLINSKAYA & SPEAR, 2008). Os principais comportamentos sociais observados em ratos incluem; cheirar o corpo do animal, cheirar a região genital e principalmente o lutar de brincadeira, que também inclui o boxear. Tais interações são essenciais para o desenvolvimento das respostas sociais e cognitivas do animal na idade adulta (HOMBERG et al., 2007). De maneira similar aos ratos mais jovens, animais adultos quando mantidos juntos, também engajam interações sociais caracterizadas por comportamentos de cheirar, perseguir o parceiro, morder e algumas vezes respostas agressivas e sexuais (TODESCHIN et al., 2009). Alterações na expressão desse repertório de comportamentos sociais podem ser indicativas de transtornos como a ansiedade e a esquizofrenia (PATIN et al., 2005; LEE et al., 2007).

1.4.2. Memória Social

A capacidade de reconhecer indivíduos de uma mesma espécie é a base sobre a qual todas as relações sociais são construídas e mantidas (KANWISHER et al., 1997; O’

CRAVEN & KANWISHER, 2000; FERGUSON et al., 2002). Em alguns casos, pode ser vantajoso se lembrar apenas de características muito gerais de um indivíduo, como o sexo ou seu estado reprodutivo. Todavia, em outros casos, pode ser necessário lembrar detalhes específicos do outro animal, como seu status social ou parentesco. A capacidade de observar e recordar informações individuais específicas são exigências para quase todos os organismos que vivem em sistemas sociais complexos (FERGUSON et al., 2002). O reconhecimento de indivíduos da mesma espécie, também chamado de reconhecimento social ou memória social, é um pré-requisito para o estabelecimento de vínculos e de hierarquia dentro de um grupo (CHOLERIS et al., 2004).

Em primatas e humanos, espécies consideradas altamente sociais, o reconhecimento individual depende principalmente das entradas visuais e auditivas. Outros mamíferos codificam a informação social através de sinais olfativos e feromonais, embora sinais auditivos e visuais possam ter influências importantes (FERGUSON et al., 2002).

Dois paradigmas experimentais são usualmente adotados para avaliar a memória social em roedores, a habituação-desabituação e a discriminação social. O primeiro protocolo baseia-se na apresentação repetida de um juvenil pré-púbere a um animal residente (habituação). Com o decorrer das apresentações, o animal residente reduz o tempo de investigação do juvenil pela capacidade de reconhecê-lo. A desabituação se dá através da apresentação de um novo juvenil e, nessa exposição, a avaliação da memória social a curto prazo é feita através da observação do instinto natural do animal residente em investigar o que ele reconhece como novo. (FERGUSON et al., 2002; BIELSKY & YOUNG, 2004). O segundo modelo experimental utilizado é a discriminação social. Nesse paradigma, um rato macho é

exposto a um juvenil durante cinco minutos e a duração do comportamento de investigar é registrada. Trinta minutos depois, o mesmo rato é exposto simultaneamente a dois juvenis, ao mesmo que ele havia interagido no primeiro teste, e a um segundo (novo juvenil). Espera-se com isso que ocorra um aumento do tempo de investigação direcionado ao juvenil novo quando a memória social for estabelecida (FERGUSON et al., 2002).

A ocitocina e a vasopressina, duas moléculas muito similares, encontram-se entre os principais reguladores das relações sociais. A liberação desses dois neuropeptídios em determinadas áreas cerebrais parece ser essencial para que os animais engajem comportamentos classificados como sociais (BIESKY & YOUNG, 2004; STORM & TECOTT, 2005).

1.4.3. Ocitocina e vasopressina

A ocitocina (OT) é um neuropeptídeo que atua em processos envolvendo reprodução, ejeção de leite e comportamento maternal (LIM & YOUNG, 2006). Esse peptídeo é sintetizado por neurônios magnocelulares do núcleo paraventricular (PVN) e supra-óptico (SON) do hipotálamo e são transportados para a neuro-hipófise antes de serem liberados periféricamente na circulação. A ocitocina também é produzida por neurônios parvocelulares no PVN, uma região que envia projeções para o hipotálamo, sistema límbico, hipocampo, amígdala, áreas estriatais, núcleo acúmbens e LC. Em humanos, o gene para OT consiste em três éxons, que codificam o sinal translocador, a ocitocina e a neurofisina associada (GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001). A molécula inicialmente produzida, chamada de OT pré-propeptídeo, sofre clivagens enquanto está sendo transportada ao longo do axônio. O produto final liberado no terminal axônico é a OT

juntamente com sua molécula carreadora, a neurofisina. Essa molécula carreadora tem a função de empacotar e armazenar a OT no terminal axonal antes da mesma ser liberada. As moléculas de neurofisina formam uma ligação com a OT dentro da vesícula secretora, sendo liberadas junto com esse peptídeo (BEM-BARAK et al., 1985; GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001).

Receptores de OT são distribuídos amplamente em várias regiões do encéfalo, incluindo o sistema olfatório, núcleos da base, sistema límbico, tálamo, hipotálamo, regiões corticais, tronco cerebral e na medula espinhal. A maior concentração desses receptores é encontrada no núcleo olfatório anterior, hipotálamo ventromedial, amígdala central e no subículo ventral (TRIBOLLET et al., 1992).

A OT central pode modular vários comportamentos como o maternal, sexual, alimentar e social (ENGELMANN et al., 2000; SABATIER, 2006). Em roedores a administração de pequenas doses desse peptídeo facilita o reconhecimento social, enquanto doses mais elevadas têm mostrado atenuar esse efeito (POPIK et al., 1992). Além disso, a administração central de antagonistas da ocitocina é efetiva em bloquear o seu efeito facilitatório sobre o reconhecimento social (BENELLI et al., 1995). O testes de reconhecimento social tem mostrado ainda que camundongos nocaute para OT apresentam enormes déficits sociais quando testados no paradigma de habituação-desabituação. Todavia, os efeitos da ocitocina sobre reconhecimento social parecem ser mais evidentes em camundongos do que em ratos. (BIELSKY & YOUNG, 2004).

Outro neuropeptídeo similar a OT é a chamada vasopressina (VP) ou hormônio anti-diurético (ADH). Essa molécula é constituída por nove aminoácidos e sua função mais amplamente descrita é o aumento na reabsorção de água nos ductos coletores renais (PERDESEN, 2006). A vasopressina é sintetizada como um pré-pro-peptídeo que consiste no peptídeo sinalizador e na neurofisina associada (neurofisina II) (CALDWELL et al., 2008). Esse peptídeo é produzido por neurônios magnocelulares do PVN e por neurônios

do SON, e sua liberação para a circulação ocorre através da hipófise posterior (TRESCHAN & PETERS, 2006). Neurônios parvocelulares do PVN, núcleo basal da estria terminal e da amígdala medial também produzem VP (DE VRIES & MILLER, 1998; DE VRIE & PANZICA, 2006). Essas origens extra-hipotalâmicas da VP podem ser dependentes de andrógenos e são provavelmente originadas de projeções sexualmente dimórficas dentro do encéfalo (DE VRIES & MILLER, 1998).

Os receptores para VP são acoplados a proteína G e consistem de três subtipos: V1a, V1b e V2, também conhecidos como VR1, VR2 e VR3 (UGRUMOV, 2002). Esses subtipos são encontrados em várias regiões como o epitélio olfatório, bulbo olfatório acessório e principal, núcleo olfatório anterior, córtex piriforme, área septal lateral, hipocampo, área amígdalo-estriatal, núcleo basal da estria terminal e regiões do hipotálamo. Os receptores localizados em áreas límbicas parecem ser os mais envolvidos na atuação desse neuropeptídeo sobre os comportamentos sociais. (RUSCIO et al., 2007; CADWELL et al., 2008).

No sistema nervoso central (SNC) a VP parece estar envolvida principalmente na formação da memória social (TOBIN et al., 2010). De acordo com esse fato, quando esse neuropeptídeo é injetado em regiões como, por exemplo, a área septal, uma melhora no reconhecimento social é observada. Todavia, quando injeções de antagonistas V1a são aplicadas nessa mesma região, grandes déficits no reconhecimento social são produzidos (BIELSKY & YOUNG, 2004).

Além do papel no reconhecimento social, a VP parece estar ainda relacionada à modulação de outros comportamentos como a ansiedade, agressividade, reconhecimento de odores e escolha de parceiros sexuais. Todos esses comportamentos, inclusive os sociais, parecem ser iniciados através de sinais olfatórios (PERDESEN & BOCCIA, 2006; CADWELL et al., 2008; HEINRICHS et al., 2009), que quando bloqueados, podem resultar em prejuízos funcionais (TOBIN et al., 2010; WACKER & LUDWIG, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

2.1 Justificativa

Modelos animais vêm sendo criados na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de psicopatologias em crianças que vivenciaram experiências estressoras durante o período gestacional. Esse período em humanos e animais tem sido apontada como a fase mais vulnerável na produção de respostas relacionadas ao estresse na prole. Assim, diversos tipos de intervenções estressoras estão sendo testadas nesse período. Em roedores, o estresse por contenção aplicado repetidamente tem sido fiel em produzir disfunções comportamentais na idade adulta. Embora a maioria dos estudos utilizando esse modelo atribua seus resultados aos seus efeitos *per se* sobre o período uterino, alterações do cuidado materno induzidas por essa intervenção também contribuem para o surgimento de psicopatologias na infância e idade adulta.

Em espécies altriciais, o cuidado fornecido pela mãe durante os primeiros dias de vida é fundamental para a sobrevivência do filhote. Além disso, este comportamento durante o período neonatal é responsável pelo chamado aprendizado olfatório, caracterizado pela associação do cuidado maternal e o odor do próprio ninho. Através da associação desses fatores, ratos neonatos aprendem a se aproximar e ter preferência pelo odor da sua mãe.

Interferências na formação da memória para odores durante o período neonatal também pode influenciar o reconhecimento e a interação de indivíduos da mesma espécie na idade adulta. Os principais candidatos envolvidos com essa aproximação entre os indivíduos são a ocitocina e a vasopressina. Esses peptídeos são produzidos pelo PVN e SON do hipotálamo e sua secreção no SNC modula os comportamentos sociais na maioria dos mamíferos. Nesse contexto, o presente trabalho justifica-se por tentar esclarecer a contribuição dos efeitos produzidos pelo estresse pré-natal sobre a mãe e/ou sobre o filhote durante o período neonatal e também na idade adulta.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi analisar as repercussões do estresse por contenção aplicado durante a última semana de gestação sobre: (1) o cuidado maternal; (2) comportamento de preferência ao odor do ninho e conteúdo de NA no BO dos filhotes; e, por fim, (3) sobre os comportamentos sociais e número de células positivas para OT e VP no PVN e SON dos mesmos filhotes na idade adulta.

3.2 Objetivos Específicos

- i. Investigar as possíveis alterações nos níveis de corticosterona em ratas prenhas submetidas á primeira sessão de estresse por contenção utilizando a técnica de ELISA para dosagem hormonal;
- ii. Avaliar se sessões diárias de estresse por contenção realizadas durante a última semana de gestação alteram o comportamento materno de ratas durante a primeira semana pós-parto;
- iii. Verificar se o estresse pré-natal por contenção e/ou possíveis alterações no cuidado materno produzem déficits no comportamento de preferência ao odor do próprio ninho em filhotes adotivos de 7 dias de idade;
- iv. Avaliar o conteúdo de NA no BO de filhotes neonatos após o teste de preferência ao odor do próprio ninho através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- v. Verificar se o estresse pré-natal por contenção e/ou, possíveis alterações do cuidado maternal comprometem a interação social de filhotes machos na idade adulta;
- vi. Investigar as repercussões do estresse pré-natal por contenção e/ou de possíveis alterações do cuidado materno sobre o número de células magnocelulares e

parvocelulares positivas para OT e VP no PVN e SON de filhotes machos adultos utilizando a técnica de imunohistoquímica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

1º ARTIGO

4.1 Animais

Foram utilizadas ratas virgens pesando (200-300g) da variedade Wistar, provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do sul. As ratas foram colocadas em caixas-residência (27 x 26 x 31 cm) com maravalha servindo de substrato. Todos o animais foram mantidos no biotério sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas, com início da fase escura às 17:00 horas. A temperatura do biotério foi mantida constante em torno de 22° C. Todos os animais tiveram livre acesso à água e comida (*ad libitum*) durante todo o período do experimento.

Em seguida, um mínimo de 4 ratas foram submetidas à coleta do esfregaço vaginal para a observação do ciclo estral. Na tarde do proestro, machos Wistar sexualmente experientes pesando em torno de 400g foram introduzidos na caixa e permaneceram por 24 horas (2 fêmeas/1 macho). Após esse período, as fêmeas tiveram o esfregaço vaginal coletado para análise da presença de espermatozóides e confirmação da concepção (BARROS et al., 2006).

4.2 Experimento I - Estresse pré-natal

No 15º dia de gestação, prenhas não estressadas foram retiradas de suas caixas-residência e anestesiadas rapidamente com halotano (1min). Logo em seguida, foram retiradas amostras de sangue (1000µl) através da punção do plexo orbital. As amostras foram colocadas em tubos heparinizados para serem centrifugados e submetidas à dosagem de corticosterona pela técnica de ELISA. Seguida as coletas, as fêmeas foram colocadas em tubos cilíndricos de plástico transparente (contensor; 13 X 6 X 8 cm). Ratas não-estressadas tiveram o sangue coletado às 09h00min. Apenas as ratas estressadas tiveram amostras de sangue coletado após a primeira sessão de estresse (30

minutos). Quatro sessões de estresse de 30 minutos foram feitas por dia (9:00; 12:00 15:00 e 18:00 hs) durante os últimos sete dias de gestação.

4.3 Experimento II – Protocolo de adoção (*cross-fostering*)

O dia do parto foi extremamente monitorado e considerado como dia zero. No primeiro dia pós-natal, dentro de um período de 6 horas de tolerância, as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes e submetidas ao procedimento de adoção cruzada (*cross-fostering*) (MOORE & POWER, 1986) (Figura II).

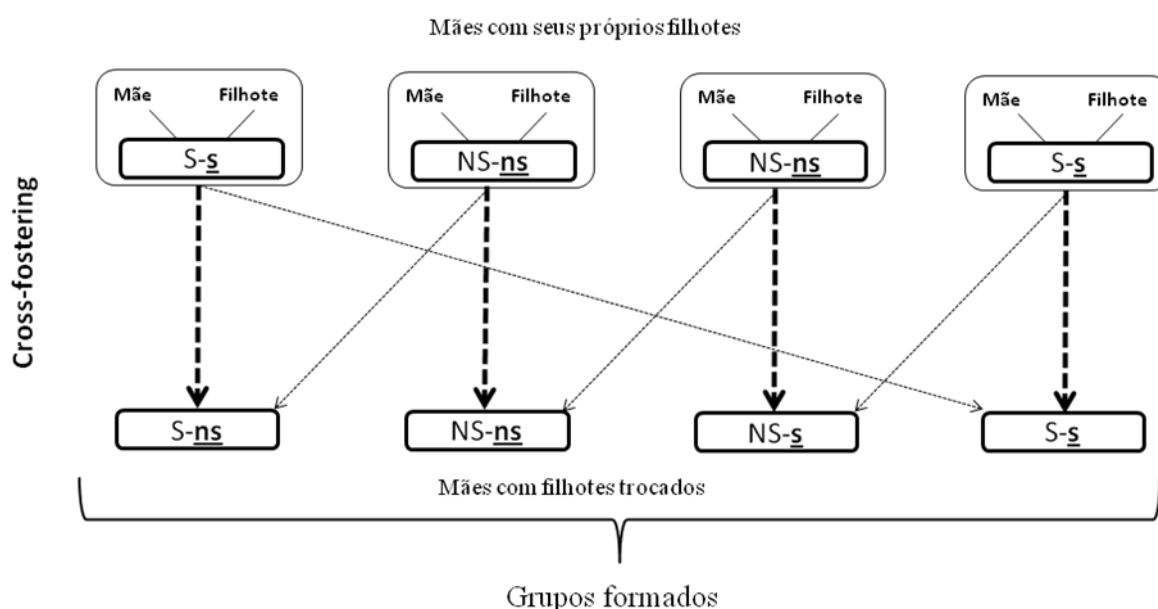


Figura II. Figura esquemática representando o protocolo de adoção (*cross-fostering*). Os quadrados representam 4 grupos de mães com seus próprios filhotes, 2 grupos de mães estressadas prenatalmente com seus próprios filhotes e 2 grupos de mães não estressadas com seus próprios filhotes. Os quadrados abaixo representam as mães com filhotes adotados de outras ninhadas. S:ns - mãe estressada prenatalmente com filhote adotivo não estressado; NS:ns - mãe não estressada prenatalmente com filhote adotivo não estressado; NS:s - mãe não estressada prenatalmente com filhote adotivo estressado prenatalmente e S:s - mãe estressada prenatalmente com filhote adotivo também estressado prenatalmente. Setas delgadas - troca dos filhotes. Setas espessas - grupos formados.

4.4 Experimento II - Dosagem de Corticosterona (ELISA)

As amostras de sangue foram rapidamente centrifugadas a 3000 rpm. O plasma foi rapidamente estocado a -80°C . A corticosterona foi extraída do plasma com acetato de etila. O extrato foi subsequentemente evaporado e dissolvido para a avaliação do hormônio pelo método de Elisa (Cayman Chemical CO., Ann Arbor, MI, USA)

4.5 Experimento IV - Registro do Comportamento Maternal

O comportamento materno das lactantes foi observado em quatro seções de 75 minutos cada, durante os seis primeiros dias pós-parto. As observações ocorreram em tempo regulares, sendo três períodos na fase clara (10:00, 13:00 e 16:00 h) e um na fase escura (18:00 h). Em cada período, o comportamento das lactantes foi observado e registrado a cada 3 minutos (25 observações por período x 4 períodos por dia = 100 observações/mãe/dia). Os comportamentos analisados foram: (1) mãe com os filhotes, (2) mãe lambendo os filhotes (lamber a superfície do corpo e a região anogenital), (3) mãe amamentando em posição de dorso bem arqueado, (4) mãe amamentando com dorso pouco arqueado, (5) postura passiva de amamentação (CHAMPAGNE et al., 2003; URIARTE et al., 2008).

4.6 Experimento V - Teste de Preferência ao Odor do Ninho

No sétimo dia pós-parto, foi realizado o teste de preferência ao odor do ninho. Foi utilizada uma caixa de acrílico de 34 cm de largura x 40 cm de comprimento x 24 cm de altura. Essa foi dividida em duas áreas de 19 cm por uma zona neutra de 2 cm. No início de cada teste, 300 mL de maravalha limpa ou maravalha do ninho da caixa residência foi colocado no canto de cada área. Filhotes machos e fêmeas foram colocados na linha que determina a zona neutra, encostado na parede oposta com a região da cabeça voltada para as áreas com maravalha. O comportamento de cada

filhote foi filmado por 1 minuto, ao fim dessa filmagem a caixa foi limpa com álcool 70% e as maravalhas foram trocadas de lado, ou seja, onde estava a maravalha limpa foi colocado a maravalha do ninho da caixa residência e onde estava a maravalha do ninho da caixa residência foi colocado maravalha limpa. Após, o mesmo filhote foi testado novamente. Esse procedimento de troca das maravalhas e novo teste ocorreram cinco vezes com um intervalo de 2 minutos entre os testes. Os vídeos foram analisados com o auxílio do programa *Noldus Observer* (*Noldus Information Technology*, Holanda), onde se verificou o tempo total que o filhote permanecia sobre cada área. Os resultados foram expressos pela soma dos tempos sobre as áreas nos 5 testes para cada filhote (RAINEKI et al., 2009).

4.7 Experimento VI - HPLC para NA e MHPG

Dez minutos após o teste de preferência ao odor do ninho (7^o dia pós-natal), os filhotes foram rapidamente decapitados e seus bulbos olfatórios foram removidos, congelados em um recipiente com isopentano em gelo seco e imediatamente armazenado a -70 ° C. Em seguida, usando um disruptor de células micro-ultrasônico, os bulbos olfatórios foram homogeneizadas em 500 uL de uma solução contendo 0,15 M de ácido perclórico, 0,1 mM de ácido etilenodiamino-tetraacético (EDTA) e 75 nM 3,4-diidroxibenzilamina (DHBA, padrão interno). Os homogenatos foram centrifugados durante 20 min a 12.000 g, e os sobrenadantes foram filtrados através de um filtro de 0,22 microns e divididos em duas partes, uma para MHPG e outro para a análise de NA. No sedimento restante, o conteúdo de proteína foi determinado utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976). A separação foi realizada utilizando uma coluna de 250 x 4 mm C18 (Purospher Star, 5 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha), precedida por uma x 4 de 4 mm C18 (Lichrospher, 5 mm, Merck (Lichrospher, 5 mm, Merck) . Para a análise

de NA, a fase móvel consistiu de 100 mM de fosfato monobásico de sódio, cloreto de sódio 10 mM, EDTA 0,1 mM, 0,95 mM de ácido octanossulfônico de sódio e metanol 16%, pH 3,5. A velocidade de fluxo foi de 0,6 mL / min e o potencial detector, 0,60 V in situ de Ag / AgCl eletrodo de referência. Para a análise do MHPG, as amostras foram hidrolisadas em ácido por aquecimento durante 5 minutos a 94 ° C, a fim de desconjugar o MHPG livre. A fase móvel consistiu de 100 mM de fosfato monobásico de sódio, cloreto de sódio 10 mM, EDTA 0,1 mM, 0,26 mM de sódio 1-octanossulfônico ácido e metanol a 4%, pH 3,5. A velocidade de fluxo foi de 0,5 mL / min e o potencial do detector de 0,65 V. NA e MHPG foram identificados pela seu tempo de retenção de pico e quantificados usando o método-padrão interno. Todas as amostras foram medidas na mesma análise. Os coeficientes de variação dentro do ensaio foram inferiores a 5%. Os níveis de NA foram considerados para estimar o estoque de neurotransmissor nas vesículas sinápticas, enquanto que os níveis de MHPG refletiu a quantidade de NA liberada na amostra (LOOKINGLAND et al., 1991). O razão MHPG/NA foi utilizado como uma medida da atividade do neurotransmissor.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

2º ARTIGO

5.1 Animais

Neste segundo estudo foram repetidos todos os protocolos experimentais de acasalamento e troca de filhotes que ocorreram no primeiro trabalho. Apenas os filhotes machos na idade adulta dos quatro grupos experimentais (NS:NS; NS:S, S:NS e S:S) foram utilizados para todos os experimentos.

5.2 Experimento I – Memória Social

O protocolo utilizado nesse experimento foi o da habituação-desabituação, usado por TODESCHIN et al., (2009) para testar a memória social em ratos adultos. Aproximadamente aos 90 dias de idade, os filhotes machos foram colocados em caixas de acrílico transparentes, isolados, com água e comida *ad libitum*, por no mínimo 7 dias. Após esse período o teste foi realizado. O teste foi feito durante o período de atividade dos animais, a partir das 18hs, com luzes apagadas e utilizando uma lâmpada vermelha como iluminação auxiliar. O procedimento ocorreu em uma sala isolada com temperatura controlada. Após os animais em suas caixas serem levados a este local, houve um período de ambientação de no mínimo 12 minutos. Em seguida o início do teste foi realizado quando um rato juvenil, 21-30 dias de idade (juvenil 1) foi apresentado ao rato adulto por 2 minutos durante 4 tempos consecutivos com 18 minutos de intervalos entre cada tempo (habituação). Durante esses intervalos o juvenil permanecia em outra sala isolada. Após os 4 testes consecutivos, um novo juvenil (juvenil 2) foi apresentado ao rato teste por 2 minutos. O teste consistiu no total de 5 exposições, sendo 4 delas (T1, T2,T3,T4) com o juvenil 1, e somente a última exposição (T5) com o Juvenil 2 (desabituação) (Figura III).

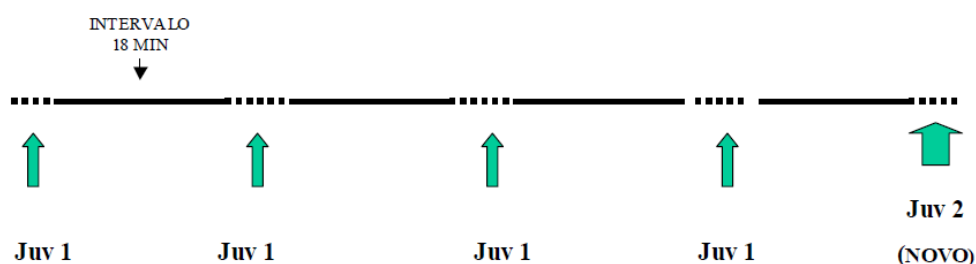


Figura III. Representação esquemática do teste de memória social, utilizando o paradigma de habituação-desabituação adotado por (Todeschin et al., 2009). Habituação como juvenil 1 e desabituação com o juvenil 2.

5.3 Parâmetros Comportamentais Avaliados

A frequência e a duração dos comportamentos foram observadas através da análise de vídeos gravados, enquanto os parâmetros comportamentais avaliados foram obtidos com a ajuda do programa The Observer (Noldus). Os principais comportamentos analisados foram: cheirar o juvenil – comportamento de cheirar ativamente o corpo do juvenil, incluindo a região genital, cauda e cabeça. Perseguir o juvenil, comportamento de aproximação do juvenil enquanto o mesmo se encontrava em movimento.

5.4 Experimento II – Interação Social

Neste protocolo, filhotes adultos dos quatro grupos experimentais foram submetidos ao teste de interação social. Esse teste foi realizado em uma arena especial segundo PATIN et al., (2005). A arena consistiu de 3 caixas de acrílico com dimensões 40x45x40cm caixas A, B com portas, e uma caixa neutra, estando ligadas por um corredor. O início do teste foi realizado quando dois animais do mesmo grupo

experimental (NS:NS X NS:NS ou S:NS X S:NS) foram isolados 24 hs antes do experimento em seu território (caixa A e B) dentro do biotério (Figura IV).

O teste ocorreu durante o período de atividade dos animais (fase escura) com iluminação auxiliar (lâmpada vermelha). Antes da realização do teste os animais foram levados até uma sala anexa, onde se aguardou o tempo de ambientação de aproximadamente 20 minutos. O início do teste foi estabelecido quando as portas das caixas A e B foram abertas, permitindo que os animais saíssem de suas caixas e explorassem toda a arena, incluindo a caixa neutra. A duração total desse teste foi de 15 minutos.

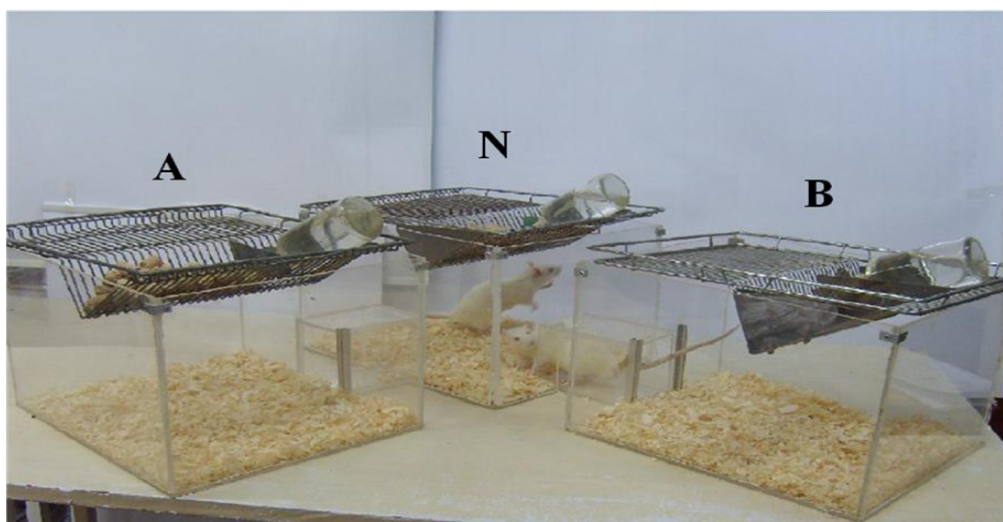


Figura IV. Aparato utilizado para o teste de interação social. Arena- A, arena - B, Caixa neutra – N

5.5 Parâmetros Comportamentais Avaliados

Para cada par de ratos testados, os seguintes parâmetros comportamentais foram avaliados: latência da primeira interação social (cheirar), tempo de interação social entre os dois animais, frequência e duração dos comportamentos agressivos entre os dois animais. As observações comportamentais foram realizadas através de gravações de vídeo e analisadas com o auxílio do programa The Observer (Noldus).

5.6 Experimento IV – Labirinto em Cruz Elevado

O teste de labirinto em cruz elevado é um método bem estabelecido e amplamente utilizado para avaliar comportamentos ligados ansiedade em roedores (BHATTACHAYA & SATYAN, 1997; WEATHINGTON et al., 2012). Ele consiste em dois braços abertos opostos (40 × 10 cm) e dois braços fechados opostos com as mesmas medidas.

Na idade adulta, os ratos dos 4 grupos experimentais (NS:NS; NS:S, S:NS e S:S) foram colocados individualmente no centro do labirinto e foram observados durante cinco minutos. Os parâmetros comportamentais avaliados foram: número de entradas e tempo gasto nos braços abertos e fechados. Subseqüentemente, a porcentagem de ambas as variáveis foram calculadas em relação ao número total de entradas e tempo gasto no braço aberto e fechado.

5.7 Perfusão e Preparação dos Tecidos

Após os testes comportamentais, os ratos foram anestesiados com ketamina e xilasina (100mg/kg de peso corporal, ip, Cristália, São Paulo-SP, Brasil) e foram perfundidos transcardiacamente com solução salina tamponada e paraformaldeído a 4% (pH 7,4) com o auxílio de uma bomba peristáltica (30ml/min, Milan Equipamentos Científicos, Colombo-PR, Brasil). Os cérebros foram removidos, pós-fixadas na mesma solução fixadora e crioprotégidos em sacarose 15% e 30% em tampão fosfato salino (PBS). Resumidamente, cortes seriados (25 µm cada) com intervalos de 100 µm foram coletados com a ajuda de um criostato e armazenados a -20 ° C em solução anti-congelante.

5.8 Experimento V - Imunoistoquímica para Ocitocina e Vasopressina no PVN e SON

Oito lâminas por animal foram utilizadas para realizar a imunoistoquímica pelo método da peroxidase (DELELLIS et al., 1979). Inicialmente, as secções foram lavadas em PBS, seguidas por um período de 30 min com peróxido de hidrogênio a 3% (H₂O₂). Após várias lavagens em PBS, as secções foram pré-incubados em solução a 1% de BSA com 0,4% de triton X-100 (PBS-Tx) para evitar ligações inespecíficas. A imunorreatividade à ocitocina foi determinada utilizando o anticorpo primário (OT Anticorpo Monoclonal PS38, uma oferta generosa do Dr. H. Gainer, NIH, EUA) a 4 ° C com diluição de 1:50 em PBS, aplicada overnight após a incubação em BSA . Os tecidos foram então lavados com PBS e incubados com anti-IgG de camundongo (Sigma, 1:100) durante 120 min. Para a imunorreatividade à vasopressina foi utilizado o anticorpo primário (VP Anticorpo Monoclonal PS41, também doado pelo Dr. H. Gainer, NIH, EUA) diluído 1:50 em PBS. Após lavagens em PBS, os cortes foram incubados com peroxidase anti-peroxidase (PAP) (1:500, Sigma, EUA, P1291) durante 1 hora e 30 min. A reação imunoistoquímica foi obtida pela incubação dos cortes em um meio contendo 0,06% de 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, EUA, D5637) e, em seguida, nova incubação na mesma solução contendo agora 1 mM de H₂O₂ a 3% por 10 min cada. Finalmente, os cortes foram lavados com PBS, desidratados com etanol, diafanizados com xilol e cobertos com bálsamo do Canadá e lamínulas. Para o controle negativo da imunoistoquímica foi realizado a omissão do anticorpo primário. Com relação às análises dos tecidos, o tamanho do corpo celular das células imunorreativas foi medido utilizando um microscópio Nikon Optiphot-2 (Japão) acoplado a uma câmara CMOS (518 CU, Micrometrics) e analisados com 1.42q imagem de software J. As células foram consideradas parvocelulares quando o diâmetro

do corpo da célula foi de 6 a 12 μm e magnocelulares se maior do que 13 μm . Neurônios positivos para OT e VP foram contados no interior da área teste no PVN e SON em ambos os hemisférios por um observador treinado sob ampliação de 200 X. Os dados foram expressos como a média do número das células positivas para OT ou VP dentro de uma área de 184.112 μm^2 (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003; WINKELMANN-DUARTE et al.,2007).

6. RESULTADOS

Artigo I

A primeira parte dos resultados foi publicada no periódico *Physiology & Behavior*, sob a forma de um artigo intitulado “*Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference*”. O referido artigo é encontrado na próxima página.



Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference

Marcelo Alves de Souza^a, Raphael Escorsim Szawka^b, Lígia Aline Centenaro^c,
Luisa Amália Diehl^d, Aldo Bolten Lucion^{a,*}

^a Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, CEP 90050-170, Brazil

^b Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, CEP 31270-901, Brazil

^c Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, CEP 90050-170, Brazil

^d Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2600, Porto Alegre, RS, CEP 90035-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2011

Received in revised form 12 October 2011

Accepted 13 October 2011

Keywords:

Prenatal stress
Noradrenaline
Maternal care
Olfactory bulb
Cross-fostering
Neonatal period

ABSTRACT

Prenatal stress (PS) and early postnatal environment may alter maternal care. Infant rats learn to identify their mother through the association between maternal care and familiar odors. Female Wistar rats were exposed to restraint stress for 30 min, 4 sessions per day, in the last 7 days of pregnancy. At birth, pups were cross-fostered and assigned to the following groups: prenatal non-stressed mothers raising non-stressed pups (NS:NS), prenatal stressed mothers raising non-stressed pups (S:NS), prenatal non-stressed mothers raising stressed pups (NS:S), prenatal stressed mothers raising stressed pups (S:S). Maternal behaviors were assessed during 6 postpartum days. On postnatal day (PND) 7, the behavior of male and female pups was analyzed in the odor preference test; and noradrenaline (NA) activity in olfactory bulb (OB) was measured. The results showed that restraint stress increased plasma levels of corticosterone on gestational day 15. After parturition, PS reduced maternal care, decreasing licking the pups and increasing frequency outside the nest. Female pups from the NS:S, S:NS, S:S groups and male pups from the S:S group showed no nest odor preference. Thus, at day 7, female pups that were submitted to perinatal interventions showed more impairment in the nest odor preference test than male pups. No changes were detected in the NA activity in the OB. In conclusion, repeated restraint stress during the last week of gestation reduces maternal care and reduces preference for a familiar odor in rat pups in a sex-specific manner.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In humans, stress experienced during pregnancy and/or unreliable maternal behavior, such as abuse or neglect of children, are associated with vulnerability to psychopathology in adult life [1,2].

In animal models, stress applied during the gestational period affects maternal behavior [3–5], increases the anxiety of mothers in the postpartum period [6], and causes changes in the physiology and behavior of the offspring in adulthood [7,8]. Maternal care can be modulated by exogenous stimuli either from own pups or from the environment [9,10]. Normal growth and behavioral development of pups seem to depend on stable mother–infant interaction [11,12].

Experimental protocols designed to analyze the effects of environmental interventions during the neonatal period may involve different durations of mother–infant separation. In the procedure known as

“neonatal handling”, the experimenter manipulates the pups for a few minutes (usually 1 to 15 min), during which time the pups are separated from the mother [13]. Previous findings have demonstrated that rat pups handled during the neonatal period present a reduction in odor preference to the own nest, an effect probably elicited by alterations in maternal care [14].

In most mammals, the identification of the mother by the pups is essential for development and survival during the first days after birth. Infant rats rapidly learn to identify, orient, approach and prefer the odor of the mother through olfactory learning [15,16]. Similar to the classic paradigm of conditioning, olfactory learning involves both maternal licking (unconditioned stimulus) and the mother's odor (conditioned stimulus) [17,18]. Thus, tactile stimulation (licking) by the mother activates the locus coeruleus (LC) [19] and increases noradrenaline (NA) levels in the olfactory bulb (OB) of pup [20]. This association activates a chain of events in the mitral neurons of the pup's OB.

The present study was designed to investigate the effects of restraint stress on the mother and offspring in Wistar rats, when applied during the last week of pregnancy. In order to separate the effects of prenatal stress on the fetuses from that on the behavior of the mother, we used a cross-fostering procedure. In the mothers, plasma corticosterone was measured on gestational day 15; and the maternal behavior was recorded during the first 6 days after delivery. In the pups, the preference

* Corresponding author at: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Fisiologia, Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento, Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, 90050-170, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 3602; fax: +55 51 3308 3656.

E-mail addresses: tiflosoles@yahoo.com.br (M.A. de Souza), reszawka@icb.ufmg.br (R.E. Szawka), lacentenaro@hotmail.com (L.A. Centenaro), diehl.luisa@gmail.com (L.A. Diehl), alucion@ufrgs.br (A.B. Lucion).

for the nest odor was analyzed on postnatal day 7. Moreover, the NA activity in the OB of the 7-day-old pups was verified.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

All experimental procedures were approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Nr. 2007907) and were in accordance with Brazilian legislation (law 11.794/08), the guidelines of the Brazilian Collegium of Animal Experimentation (COBEA) on the care and use of animals in research and teaching. Seventy virgin female Wistar multiparous rats were obtained from a breeding colony at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil). Rats were maintained on a 12 h light–dark cycle (lights on at 6 a.m.), with a room temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and relative humidity around 50% with water and food (Rodent chow, Nutrilab, Colombo, Brazil) freely available at all times.

The estrous cycle was daily verified by vaginal smear and once the proestrus phase was detected in at least 4 females, these animals were individually mated with a sexually experienced male for 24 h in polycarbonate cages ($24 \times 20 \times 47$ cm). The first day of pregnancy was confirmed by the presence of sperm in the vaginal smear up to 12 h after mating.

2.2. Prenatal stress procedure

During the last days of pregnancy (days 15 to 21), females were submitted to four sessions of 30-min restraint stress during each day (at 9:00, 12:00, 15:00 h on the light phase of the cycle, and 18:00 h on the dark phase). During these periods of stress, each rat was maintained in a $24 \times 9 \times 5$ cm Plexiglas restraint apparatus.

2.3. Plasma corticosterone assay

On gestational day 15 (first day of restraint) at approximately 9:30 a.m., the stressed females were removed from the restraint, anesthetized with halothane (Cristalia, Brazil, code 4210-3), and a blood sample (approximately 500 μL) was quickly obtained by puncturing the animal's orbital plexus. On the same gestation day, the control non-stressed females were removed from the home cage and blood was collected using the same procedure.

The blood samples were centrifuged at 3000 rpm and plasma was stored at -80°C . Corticosterone was extracted from plasma with ethyl acetate; the extract was subsequently evaporated and dissolved for hormone evaluation with an ELISA kit (Cayman Chemical CO., Ann Arbor, MI, USA).

2.4. Cross-fostering

On the day of birth, pups were counted and culled to 8 pups per litter. Soon after that, the pups were cross-fostered according to the prenatal stress, and 4 groups were established:

1. Mothers that were not submitted to prenatal stress raising cross-fostered non-stressed pups ($n = 9$, NS:NS)
2. Mothers that were not submitted to prenatal stress raising cross-fostered pups that were prenatally stressed ($n = 11$, NS:S)
3. Prenatally stressed mothers raising cross-fostered non-stressed pups ($n = 10$, S:NS)
4. Prenatally stressed mothers raising cross-fostered stressed pups ($n = 10$, S:S)

In the present experiment, all pups were cross-fostered.

2.5. Maternal behavior

After delivery, mothers were housed individually in a fresh polypropylene cage ($16 \times 28 \times 42$ cm), with wood shavings as bedding material. Food and water were available *ad libitum* and the room temperature was maintained at 20 – 24°C . Maternal behavior was observed daily during 4 periods of 72 min each. Three periods of observation were conducted during the light phase of the cycle (10:00, 13:00, 16:00 h) and one when the lights were already off (18:00 h) in the first 6 postpartum days by a trained observer. Within each observation period, the behavior of the mothers was scored every 3 min (25 observations/period \times 4 periods/day = 100 observations/mother/day). Data are expressed as means \pm SEM of the sum of total frequencies from a total of 600 observations for each rat (100 observations/day during the first six postpartum days).

The following behaviors of the mothers were recorded: mother outside the nest, the mother is away from the nest and without physical tactile contact with the pups; licking the pups, either the body surface or its anogenital region; nursing, the mother nurses the pups in either an arched-back posture, a blanket posture, in which the mother lays over the pups, or a supine posture, in which the mother is lying either on her back or side while the pups nurse. Total nursing frequency was obtained by the sum of the frequency of the behaviors of the mother directed towards the pups.

2.6. Nest odor preference test

The nest odor preference test was based on studies testing the associative olfactory learning [16,21], and adapted by Raineki et al. [14]. The test was performed on postnatal day (PND) 7, the age at which the olfactory learning mechanism was analyzed in previous studies [16,21], and consisted in a two-odor choice between one area with the nest bedding and another with fresh bedding. A Plexiglas box (34 cm long \times 24 cm high \times 40 cm wide) divided in two equal parts by a 2 cm wide neutral zone was used for the test. In one end of each area, 300 mL of bedding (fresh bedding or nest bedding) were placed in the corners. The pup was placed in the 2-cm neutral zone at the opposite end of the box, facing the target beddings. The amount of time spent by pups over each of the two areas was recorded in a 1-min trail test. The pup was considered to be in one area when it turned its head or the whole body to one of box sides. Animals were tested for 5 trials with an interval of 2 min between each one. After the trial, the pup was taken back to its home cage, where the mother was, and placed in a corner separated from the litter. During each trial interval, the testing box was washed with 70% ethanol to remove odors and the bedding materials were switched to the alternate side of the box. The video recordings were later analyzed using the Noldus Observer software (Noldus Information Technology, Netherlands). The total time (s) spent by pups in each area was obtained by the sum of the 5 trials.

2.7. High performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED)

The levels of NA and its metabolite, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG), were analyzed in the pup's OB, as previously described [20]. Briefly, pups were rapidly decapitated on PND 7. Ten minutes after the nest odor preference test, the olfactory bulbs were removed, frozen in a container with isopentane in dry ice and immediately stored at -70°C . Then, using a microultrasonic cell disrupter, olfactory bulbs were homogenized in 500 μL of a solution containing 0.15 M perchloric acid, 0.1 mM EDTA and 75 nM 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA, internal standard). The homogenates were centrifuged for 20 min at 12,000 g and supernatants filtered through a 0.22- μm filter and divided in two parts, one for MHPG and another for NA analysis. In the remaining pellet, protein content was determined using the Bradford method [22]. Separation was performed using a 250×4 -mm C18 column (Purospher Star, 5 μm , Merck,

Darmstadt, Germany), preceded by a 4×4-mm C18 (Lichrospher, 5 μm, Merck). For NA analysis, the mobile phase consisted of 100 mM sodium dihydrogen phosphate, 10 mM sodium chloride, 0.1 mM EDTA, 0.95 mM sodium 1-octanesulfonic acid and 16% methanol, pH 3.5. The flow rate was 0.6 mL/min and the detector potential, 0.60 V vs. *in situ* Ag/AgCl reference electrode. For MHPG analysis, samples were acid hydrolyzed by heating for 5 min at 94 °C in order to deconjugate free MHPG [23]. The mobile phase consisted of 100 mM sodium dihydrogen phosphate, 10 mM sodium chloride, 0.1 mM EDTA, 0.26 mM sodium 1-octanesulfonic acid and 4% methanol, pH 3.5. The flow rate was 0.5 mL/min and the detector potential, 0.65 V. NA and MHPG were identified by their peak retention time and quantified using the internal-standard method. All samples were measured in the same analysis. The intra-assay coefficients of variation were less than 5%. NA levels were considered to estimate neurotransmitter stock in the synaptic vesicles, whereas MHPG levels reflected the amount of NA released in the sample [23]. The MHPG/NA ratio was used as a measure of neurotransmitter turnover.

2.8. Statistical analysis

Corticosterone levels of the mothers were evaluated using the Mann–Whitney U-test and the data presented as median (inter-quartile range IQR). Behavioral and neurochemical data were analyzed using one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls post-hoc test. In the nest odor preference test, the amount of time spent outside the neutral zone was analyzed using two-way ANOVA with the experimental groups and area of the testing apparatus as factors and Bonferroni post-hoc test was used for multiple comparisons. The differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Maternal plasma corticosterone

Corticosterone plasma levels (ng/mL) in the pregnant rats increased after 30 min of restraint stress, with a median (IQR) of 1000 (636.3–1375.0), compared with non-stressed rats with a median (IQR) of 187.5 (82.5–450.0), ($U = 5.0$; $p < 0.05$). These data show the release of corticosterone in response to restraint stress after the first session on gestational day 15 ($n = 8$ for group).

3.2. Maternal behavior

In maternal behavior, restraint stress produced no changes in the frequency of the different nursing styles. Similarly, when total nursing frequency was examined between the groups (NS:NS, NS:S, S:NS and S:S) no significant difference was found (one-way ANOVA $F_{(3,36)} = 2.4$; $p = 0.08$) (Fig. 1A). On the other hand, the frequency of mother outside the nest in the S:NS and S:S groups showed significant increase when compared to NS:NS group (one-way ANOVA $F_{(3,36)} = 5.9$; $p = 0.002$) followed by Newman–Keuls post hoc test (Fig. 1B). For licking/grooming, the S:NS and S:S group showed a significant decrease when compared with NS:NS group (one-way ANOVA $F_{(3,36)} = 3.3$; $p = 0.03$) followed by Newman–Keuls post hoc test (Fig. 1C).

3.3. Nest odor preference test

Male pups from the S:S group exhibited no preference for the nest bedding area compared to the fresh bedding one, while all other groups (NS:NS, NS:S and S:NS) showed a marked preference for the nest area instead of fresh area. Two-way ANOVA showed significant main effect for area $F_{(1,70)} = 41.4$; $p < 0.0001$, no main effect for group $F_{(3,70)} = 0.2$; $p = 0.9$, but significant interaction (group and area) $F_{(3,70)} = 7.4$; $p = 0.0002$ (Fig. 2A). Regarding female pups, only the NS:NS group showed a clear preference for the nest bedding area. Two-way ANOVA

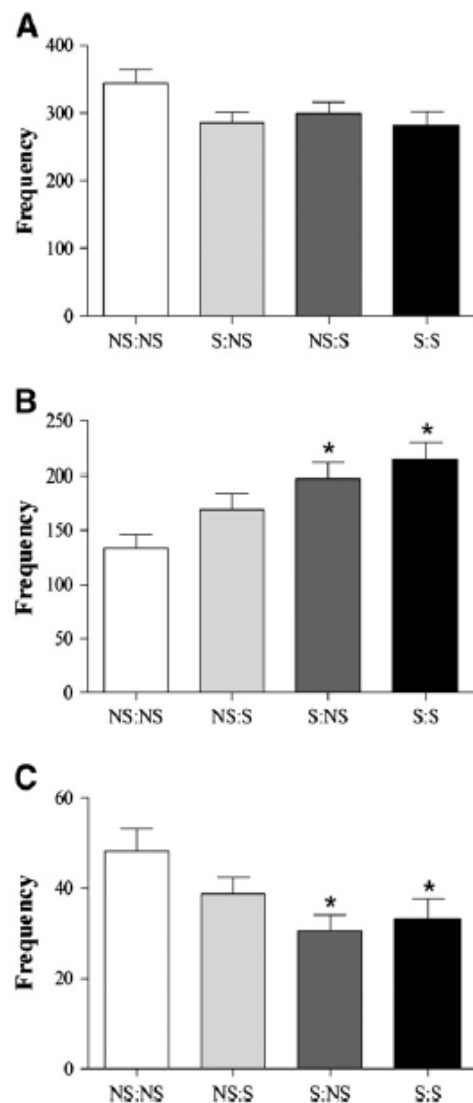


Fig. 1. Maternal behavior of primiparous lactating rats. Data are shown as mean \pm SEM of frequency from a total of 600 observations for each rat (100 observations per day). (A) Total frequency for nursing behavior. No significant difference was found in any group. (B) Total frequency of the mothers outside the nest. (C) Total frequency for licking behavior. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls post hoc test. * $p < 0.05$ compared with NS:NS group. ($n = 9–11$ per group).

showed main effect for area $F_{(1,70)} = 18.0$; $p < 0.0001$, no main effect for group $F_{(3,70)} = 0.2$; $p = 0.8$, but significant interaction between the main factors $F_{(3,70)} = 6.6$; $p = 0.0006$. Thus, female pups that were submitted to pre or post natal stress (NS:S, S:NS and S:S groups), showed no preference for the nest odor (Fig. 2B).

3.4. NA and MHPG levels in the OB of pups

Fig. 3A, B and C shows NA, MHPG content and MHPG/NA ratio in the OB of 7-day-old male and female pups. No significant difference was observed for NA, MHPG or MHPG/NA in male pups (one-way ANOVA, $F_{(3,24)} = 1.5$; $F_{(3,24)} = 0.2$ and $F_{(3,24)} = 0.9$, respectively). Regarding female pups, NA levels were higher in the S:NS and NS:S groups than in the NS:NS and S:S groups (one-way ANOVA $F_{(3,24)} = 7.2$; $p = 0.001$), followed by Newman–Keuls post-hoc test (Fig. 3D). For the MHPG levels, one-way ANOVA determined a significant difference among groups ($F_{(3,24)} = 3.7$; $p = 0.02$) (Fig. 3E), but the post-hoc test did not detect any significant difference. For the MHPG/NA ratio, there was no difference among groups (one-way ANOVA, $F_{(3,24)} = 0.3$) (Fig. 3F).

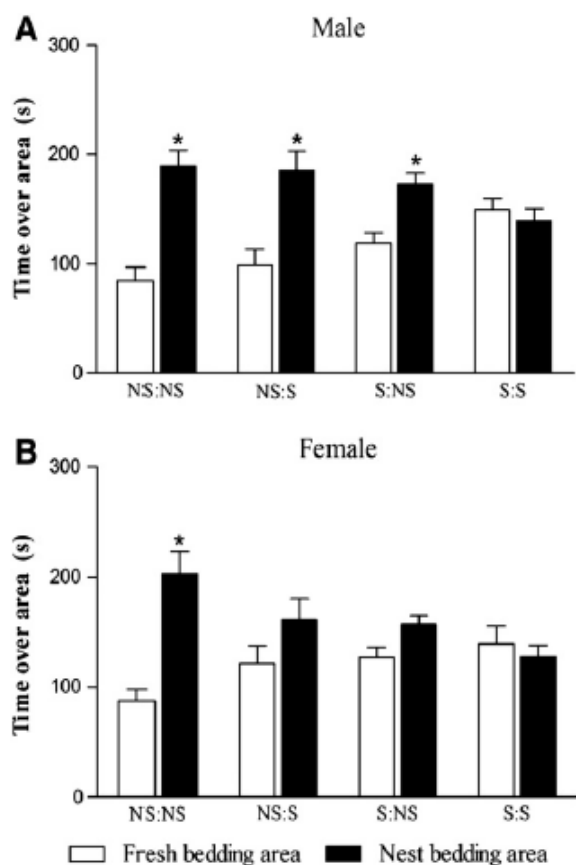


Fig. 2. Data are shown as mean \pm SEM of time (s) spent over nest and fresh bedding area of NS:NS, NS:S, S:NS and S:S groups of male (A) and female (B) pups in the nest odor preference test. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. * $p < 0.05$ significant difference from the fresh bedding area of same group ($n = 9$ – 10 per group).

4. Discussion

The results show that prenatal stress abolished the natural preference for the nest odor in 7-day-old female rat pups (S:S group), even when they were raised by non-stressed mothers (NS:S group). Moreover, female pups that were not submitted to prenatal stress but were raised by mothers that were restrained during the last 2 weeks of pregnancy (S:NS) also showed no behavioral preference for fresh bedding or their own nest bedding. On the other hand, in male pups, the nest odor-directed behavior was only affected when they were prenatally stressed and raised by a mother that was also submitted to the gestational stress (S:S group). In males, only the combination of prenatally stressed pups being raised by stressed mothers during gestation (S:S) induced no behavioral preference for their own nest bedding. Thus, this preference appears to be more resistant to environmental interventions in male than female pups. It seems that compared to male pups, female pups are more susceptible to both prenatal stress, which increases plasma glucocorticoids in the pregnant females (NS:S) and reduced maternal behavior (S:NS) during the neonatal period, as well as the combination of the two situations.

The differences between the sexes in the nest odor preference test may be explained by the stimulus provided by the mothers. Given that during the neonatal period, lactating rats naturally spend more time interacting with male than female pups [24,25], a further reduction in the maternal care, induced by the gestational stress, probably contributed to the remarkable difference seen between the sexes. Indeed, the reduction in maternal behavior affected the preference of female pups that were not prenatally stressed, but not male pups in the same condition. In agreement with previous reports showing that maternal care reversed the aversive effects of stress during gestation [26–28], we postulate

that the normal behavior of non-stressed mothers could have attenuated the outcome of prenatal stress in the male pups, but not in the female ones. Indeed, sex-based effects of gestational stress can still be seen in the hypothalamus pituitary adrenal (HPA) axis of adult rats, with females being more sensitive than males when exposed to gestational stress [29]. Moreover, adult females seem to be more likely to present changes in the HPA axis due to stress than males [30–32].

In contrast to our initial hypothesis, the NA activity, as measured by quotient of the NA metabolite, MHPG, and the amount of NA in the OB, after the nest odor preference test was not altered by the prenatal stress and/or the reduced maternal behavior in male and female pups. Although an increase in the NA level was shown in two groups of female pups, no significant difference was observed in its activity. In neonate rats, the NA input from the locus coeruleus (LC) to the OB is necessary for the olfactory memory [20], in which NA increases cyclic AMP levels inducing phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein CREB [33,34]. The lack of effect of prenatal stress on NA activity in the OB is in contrast with a previous finding from our group, in which the postnatal handling procedure decreased NA activity in the OB at PND 7 in both male and female pups [20]. This discrepancy may well be explained by the period of the stress and the different protocols adopted (prenatal stress and neonatal handling), since the handling procedure induces bursts of increased levels of maternal care [13], while prenatal stress produces the opposite effect on maternal care. Additionally, according to Meaney [35], high and low levels of maternal care may induce different effects on the neuroendocrine systems in the offspring.

NA content increased in the OB of prenatally stressed female pups raised by non-stressed mothers (NS:S group) and pups raised by prenatally stressed mothers (S:NS group), but surprisingly the content did not change when female pups were submitted to both conditions, as was initially expected. Given that the experiment measured the activity on PND 7, and the pups were raised by the foster mothers since the day of birth, the temporal effect of maternal care should be taken into consideration. In fact, in all measurements, the cumulative effect of the maternal behavior on the infant is an important variable to be considered. We may infer that in the S:S female pups, NA content in the OB increased during the first days after birth due to the combination of the prenatal stress and the reduced maternal care, and then, decreased to the levels of the control group at PND 7. The changes in NA levels in the pups' OB induced by prenatal stress or the reduction in maternal care may not be constant.

In prenatally stressed pups, the results here described were the consequence of the intra-uterus stress and the changes in maternal behavior derived from the restraint stress during gestation. Indeed, the environmental intervention (repeated restraint stress of the pregnant female) was the variable analyzed, and the fetuses were submitted to it through the mother. Later on, after birth, again the changes in the behavior of the lactating female probably affected the behavior of the infants. Another experimental aspect to be considered is the cross-fostering procedure. In order to analyze the impact on the offspring, a cross-fostering protocol was designed in order to separate the effects of PS and postnatal environment (maternal care). However, this procedure *per se* may have influenced the results obtained, since cross-fostering is known to influence maternal care [51].

The present study shows, furthermore, that corticosterone levels increased in response to stress during gestation in rats, at least after the first stress episode on gestational day 15. Although we do not have the values for the corticosterone levels after the repeated restraint stress on gestational day 21, a previous study reported increased corticosterone levels in females submitted to restraint stress at the end of pregnancy using a similar stress protocol [36]. Thus, pregnant rats may respond to stress during the last week of pregnancy with an increase in plasma corticosterone after the stress episode and a reduction in maternal behavior during lactation. Both changes may have affected the offspring in our study.

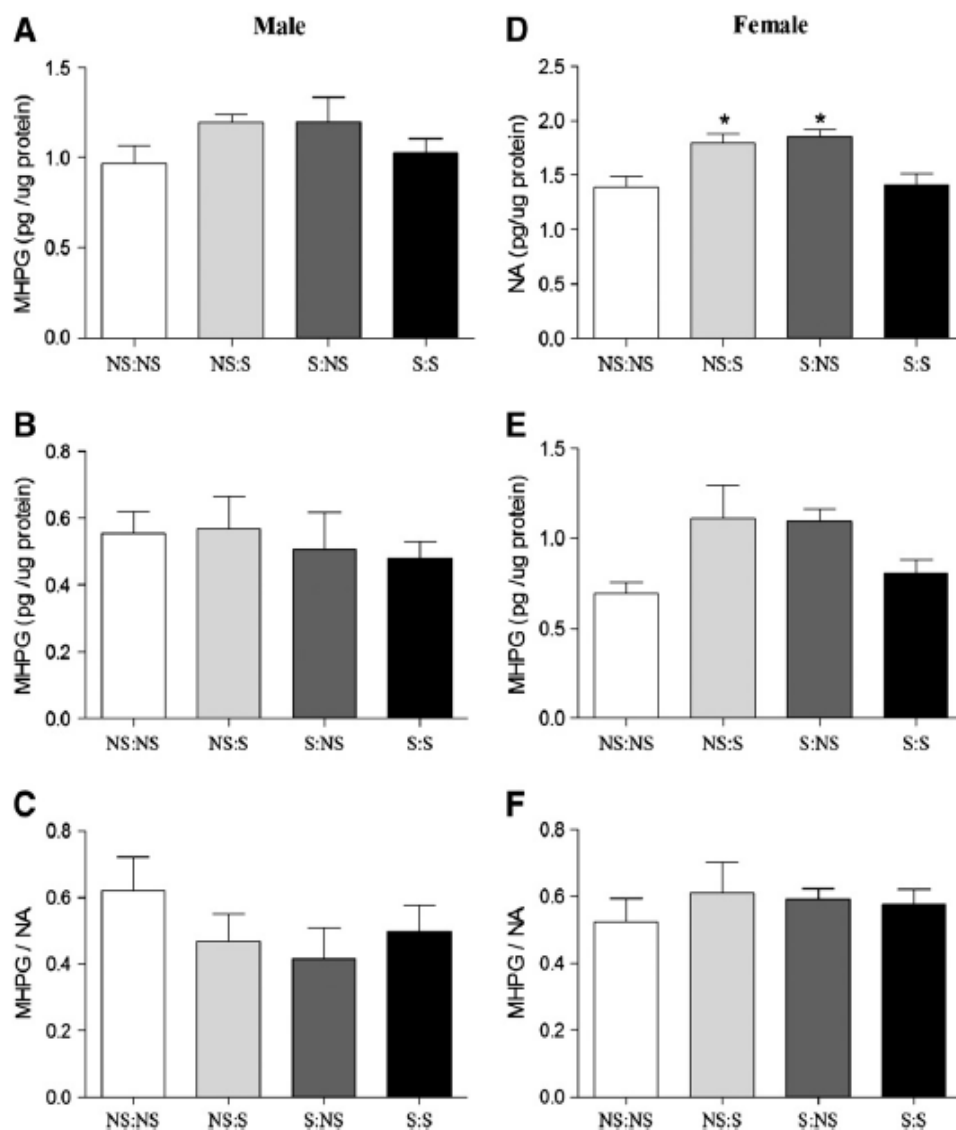


Fig. 3. Noradrenergic activity in the OB of pups on PND 7. Data are shown as mean \pm SEM of NA (A, D), MHPG (B, E) levels and MHPG/NA ratio (C, F) of male and female pups respectively. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls post hoc test. * $p < 0.05$ ($n = 7$ per group).

Maternal care is considered a key behavior for the natural basis of mother–infant relationships [11]. In the present study, stressed mothers raising non-stressed pups (S:NS) and stressed mothers raising stressed pups (S:S) showed a lower frequency of licking and a higher frequency of time spent by the mother outside the nest compared with non-stressed mothers raising non-stressed pups (NS:NS). Our data show that restraint stress selectively affected two types of maternal behavior patterns: licking and absence from the nest. These effects of prenatal stress on the maternal care are in agreement with several studies involving stress protocols applied during the last weeks of gestation in rats [3,37,38]. The long-lasting impact of prenatal stress can be detected in the elevated plus-maze test after PND 21, in which the prenatally stressed mothers were shown to be more anxious than the unstressed ones, and showed an impaired ability to cope with inescapable situations [6]. These results show that pregnancy constitutes a period of high vulnerability to the effects of stress even after the end of the stressor stimulus [6,41]. On the other hand, other studies found no change in maternal care after gestational stress [38–40].

The medial preoptic area of the hypothalamus (MPOA) is a critical region for the expression of maternal behavior in rodents [42]. The exposure of female rats characterized as having a high-licking maternal behavior pattern to prenatal stress led to a reduction not only of this behavior, but also of the oxytocin receptor expression in MPOA

to the levels of female rats characterized as low-licking [36]. Differences in oxytocin receptor levels of high licking and low licking mothers were also previously observed in other brain areas [43,44]. We did not measure oxytocin receptor expression, but there is evidence to suggest that glucocorticoids exert negative regulatory effects on central oxytocin receptor expression [45,46]. Thus, the increased corticosterone levels produced by the restraint stress protocol may be implicated in the observed reduction in maternal care.

In summary, the results provide evidence that repeated restraint stress during the last week of gestation increases plasma corticosterone in the pregnant female; reduces maternal care; and affects the preference of the pups for a familiar odor in a sex-specific manner. Repeated restraint stress during the last week of pregnancy was an effective stressor agent, as demonstrated by the increased corticosterone levels in the pregnant rats. The intervention also reduced maternal behavior, leading to a decrease in licking behavior and an increase in the frequency with which the mother spent time off the nest away from the pups. In the pups, the odor preference test showed that when both adverse conditions coexisted, prenatal stress and inappropriate maternal behavior of the stressed mothers, no preference for the own nest bedding area was observed in both sexes. However, sex differences were observed. In female pups, the nest odor preference was abolished when they experienced either, intra-uterus prenatal stress or reduced maternal care, while in male pups the nest

odor preference was only abolished when they experienced a combination of both restraint stress and reduced maternal care. Thus, 7-day-old female pups that suffered perinatal interventions seem to be more impaired in the nest odor preference test than the males. Surprisingly, no changes were found to the NA activity in the OB, a neurotransmitter previously described as being involved in olfactory preference [21,47,48]. It is likely that other neurotransmitter systems, such as serotonin, which plays a synergistic role along with NA [49,50] may be involved in this behavioral response which needs to be investigated.

Acknowledgments

The authors would like to thank Régis Gemerasca Mestriner for his technical assistance and Marcella Casagrande for her useful comments.

This study was supported by grants from CNPq, FAPESP, FAPERGS and CAPES.

References

- Brayden RM, Altemeier WA, Tucker DD, Dietrich MS, Vietze P. Antecedents of child neglect in the 1st 2 years of life. *J Pediatr* 1992;120:426–9.
- Maughan B, McCarthy G. Childhood adversities and psychosocial disorders. *Br Med Bull* 1997;53:156–69.
- Bosch OJ, Musch W, Bredewold R, Slattery DA, Neumann ID. Prenatal stress increases HPA axis activity and impairs maternal care in lactating female offspring: implications for postpartum mood disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32:267–78.
- Meek LR, Dittel PL, Sheehan MC, Chan JY, Kjolhaug SR. Effects of stress during pregnancy on maternal behavior in mice. *Physiol Behav* 2001;72:473–9.
- Patin V, Lordi B, Vincent A, Thoumas JL, Vaudry H, Caston J. Effects of prenatal stress on maternal behavior in the rat. *Dev Brain Res* 2002;139:1–8.
- Darnaudey M, Dutriez I, Viltart O, Morley-Fletcher S, Maccari S. Stress during gestation induces lasting effects on emotional reactivity of the dam rat. *Behav Brain Res* 2004;153:211–6.
- Kofman O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2002;26:457–70.
- Weinstock M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav Immun* 2005;19:296–308.
- Nelson EE, Panksepp J. Brain substrates of infant–mother attachment: contributions of opioids, oxytocin, and norepinephrine. *Neurosci Biobehav Rev* 1998;22:437–52.
- Walker CD, Deschamps S, Proulx K, Salzman C, Woodside B, Lupien S, et al. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. *J Psychiatry Neurosci* 2004;29:364–82.
- Heming AS, O'Day DH, Kraemer GW. Neurobiology of mother–infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neurosci Biobehav Rev* 1999;23:673–85.
- Cameron NM, Champagne FA, Fish C, Ozaki-Kuroda K, Meaney MJ. The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29:843–65.
- Macri S, Wurbel H. Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: a critical review of the maternal mediation hypothesis. *Horm Behav* 2006;50:667–80.
- Raineki C, De Souza MA, Szawka RE, Lutz ML, De Vasconcelos IFT, Sanvitto GL, et al. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and cyclic amp response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. *Neuroscience* 2009;159:31–8.
- Leon M. Neuroethology of olfactory preference development. *J Neurobiol* 1992;23:1557–73.
- McLean JH, Harley CW. Olfactory learning in the rat pup: a model that may permit visualization of a mammalian memory trace. *Neuroreport* 2004;15:1691–7.
- Leon M. Compensatory responses to early olfactory restriction. *Ann N Y Acad Sci* 1998;855:104–8.
- Sullivan RM, Kimura F, Sakaguchi T. Developing a sense of safety — the neurobiology of neonatal attachment. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1008:122–31.
- Nakamura S, Kimura F, Sakaguchi T. Postnatal-development of electrical-activity in the locus-coeruleus. *J Neurophysiol* 1987;58:510–24.
- Sullivan RM, Wilson DA. Molecular biology of early olfactory memory. *Learn Mem* 2003;10:1–4.
- Sullivan RM, Wilson DA, Leon M. Norepinephrine and learning-induced plasticity in infant rat olfactory system. *J Neurosci* 1989;9:3998–4006.
- Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- Lookingland KJ, Ireland LM, Gunnert JW, Manzanares J, Tian Y, Moore KE. 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethylglycol concentrations in discrete hypothalamic nuclei reflect the activity of noradrenergic neurons. *Brain Res* 1991;559:82–8.
- Moore CL, Wong L, Daum MC, Ledaier OU. Mother–infant interactions in two strains of rats: implications for dissociating mechanism and function of a maternal pattern. *Dev Psychobiol* 1997;30:301–12.
- Melniczek JR, Ward IL. Patterns of anogenital licking mother rats exhibit toward prenatally stressed neonates. *Physiol Behav* 1994;56:457–61.
- Barros VG, Rodriguez P, Martijena ID, Perez A, Molina VA, Antonelli MC. Prenatal stress and early adoption effects on benzodiazepine receptors and anxiogenic behavior in the adult rat brain. *Synapse* 2006;60:609–18.
- Barros VG, Berger MA, Martijena ID, Sarchi MI, Perez AA, Molina VA, et al. Early adoption modifies the effects of prenatal stress on dopamine and glutamate receptors in adult rat brain. *J Neurosci Res* 2004;76:488–96.
- Fujioka T, Fujioka A, Tan N, Chowdhury GMI, Mouri H, Sakata Y, et al. Mild prenatal stress enhances learning performance in the non-adopted rat offspring. *Neuroscience* 2001;103:301–7.
- Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32:1073–86.
- McCormick CM, Smythe JW, Sharma S, Meaney MJ. Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic–pituitary–adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult-rats. *Dev Brain Res* 1995;84:55–61.
- Richardson HN, Zorrilla EP, Mandyam CD, Rivier CL. Exposure to repetitive versus varied stress during prenatal development generates two distinct anxiogenic and neuroendocrine profiles in adulthood. *Endocrinology* 2006;147:2506–17.
- Weinstock M, Matlina E, Maor G, Rosen H, McEwen BS. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic–pituitary adrenal system in the female rat. *Brain Res* 1992;595:195–200.
- McLean JH, Harley CW, Darby-King A, Yuan Q. pCREB in the neonate rat olfactory bulb is selectively and transiently increased by odor preference-conditioned training. *Learn Mem* 1999;6:608–18.
- Yuan Q, Harley CW, Bruce JC, Darby-King A, McLean JH. Isoproterenol increases CREB phosphorylation and olfactory nerve-evoked potentials in normal and 5-HT-depleted olfactory bulbs in rat pups only at doses that produce odor preference learning. *Learn Mem* 2000;7:413–21.
- Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:1161–92.
- Champagne FA, Meaney MJ. Stress during gestation alters postpartum maternal care and the development of the offspring in a rodent model. *Biol Psychiatry* 2006;59:1227–35.
- Del Cerro MCR, Perez-Iaso C, Ortega E, Martin JLR, Gomez F, Perez-Izquierdo MA, et al. Maternal care counteracts behavioral effects of prenatal environmental stress in female rats. *Behav Brain Res* 2010;208:593–602.
- Smith JW, Seckl JR, Evans AT, Costall B, Smythe JW. Gestational stress induces post-partum depression-like behaviour and alters maternal care in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2004;29:227–44.
- Fameli M, Kitraki E, Stylianopoulou F. Maternal-behavior of dams treated with ACTH during pregnancy. *Physiol Behav* 1995;57:397–400.
- Pardon MC, Gerardin P, Joubert C, Perez-Diaz F, Cohen-Salmon C. Influence of prepartum chronic ultramild stress on maternal pup care behavior in mice. *Biol Psychiatry* 2000;47:858–63.
- Darnaudey M, Maccari S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Res Rev* 2008;57:571–85.
- Numan M, Callahan EC. The connections of the medial preoptic region and maternal-behavior in the rat. *Physiol Behav* 1980;25:653–65.
- Champagne F, Diorio J, Sharma S, Meaney MJ. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12736–41.
- Francis DD, Champagne FC, Meaney MJ. Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *J Neuroendocrinol* 2000;12:1145–8.
- Liberzon I, Young EA. Effects of stress and glucocorticoids on CNS oxytocin receptor binding. *Psychoneuroendocrinology* 1997;22:411–22.
- Patchev VK, Schlosser SF, Hassan AHS, Almeida OFX. Oxytocin-binding sites in rat limbic and hypothalamic structures — site-specific modulation by adrenal and gonadal-steroids. *Neuroscience* 1993;57:537–43.
- Sullivan RM, Wilson DA. The role of norepinephrine in the expression of learned olfactory neurobehavioral responses in infant rats. *Psychobiology* 1991;19:308–12.
- Sullivan RM, Stackenwalt G, Nasr F, Lemon C, Wilson DA. Association of an odor with activation of olfactory bulb noradrenergic beta-receptors or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonatal rats. *Behav Neurosci* 2000;114:957–62.
- Yuan Q, Harley CW, McLean JH. Mitral cell beta(1) and 5-HT2A receptor colocalization and cAMP coregulation: a new model of norepinephrine-induced learning in the olfactory bulb. *Learn Mem* 2003;10:5–15.
- Langdon PE, Harley CW, McLean JH. Increased beta adrenoceptor activation overcomes conditioned olfactory learning deficits induced by serotonin depletion. *Dev Brain Res* 1997;102:291–3.
- Maccari S, Piazza PV, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, Lemoal M. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J Neurosci* 1995;15:110–6.

Artigo II

A segunda parte dos resultados também foi submetido ao periódico *Physiology & Behavior* sob a forma de um artigo intitulado “*Prenatal stress produces social behavior deficits and alters the number of oxytocin and vasopressin neurons in adult rats*”.

Elsevier Editorial System(tm) for Physiology & Behavior
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Prenatal stress produces social behavior deficits and alters the number of oxytocin and vasopressin neurons in adult rats

Article Type: Research paper

Keywords: Prenatal stress; cross-fostering; social memory; social interaction; oxytocin; vasopressin

Corresponding Author: Mr. Marcelo Alves de Souza, M.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Marcelo Alves de Souza, M.D.

Order of Authors: Marcelo Alves de Souza, M.D.; Lígia A Centenaro, PhD; Pâmela R Menegotto, Graduate student; Thiago P Henriques, M.D.; Juliana Bonini, PhD; Matilde Achaval, PhD; Aldo B Lucion, PhD

Abstract: The purpose of this study was to analyze the effects of repeated restraint stress on social behaviors in Wistar rats in adulthood when only the mothers and/or offspring were submitted to the prenatal stress protocol. Female Wistar rats were exposed to 30 min of restraint stress 4 times per day in the last 7 days of pregnancy. At birth, pups were cross-fostered and assigned to the following groups: prenatally non-stressed offspring raised by prenatally non-stressed mothers (NS:NS), prenatally non-stressed offspring raised by prenatally stressed mothers (S:NS), prenatally stressed offspring raised by prenatally non-stressed mothers (NS:S), prenatally stressed offspring raised by prenatally stressed mothers (S:S). As adults, male offspring underwent social recognition and interaction tests. The number of oxytocin (OT) and vasopressin (VP) neurons in the paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei of hypothalamus were analyzed. The results show that prenatal stress induced a decrease in social behaviors in the NS:S and S:S groups. Only the combination of prenatally stressed offspring with stressed mothers (S:S) exhibited increased anxiety and aggressive behavior. Social behavior deficits were more linked to a reduction in the number of VP-neurons than OT-neurons in the PVN. In conclusion, prenatal stress reduced social behavior in adult males. On the other hand, when applied exclusively to the mother, prenatal stress produced no effect. Morphologic changes produced by this intervention were more apparent in the vasopressinergic system than in the oxytocinergic system.

PRENATAL STRESS PRODUCES SOCIAL BEHAVIOR DEFICITS AND ALTERS
THE NUMBER OF OXYTOCIN AND VASOPRESSIN NEURONS IN ADULT
RATS

Marcelo Alves de Souza^{a*}, Lígia Aline Centenaro^b, Pâmela Rossi Menegotto^a, Thiago
Pereira Henriques^a, Juliana Bonini^c, Matilde Achaval Helena^b, Aldo Bolten Lucion^a

^a *Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul. Sarmiento Leite, 500. Porto Alegre, RS. CEP 90050-170.
Brazil.*

^b *Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Sarmiento Leite, 500. Porto Alegre, RS.
CEP 90050-170, Brazil.*

^c *Departamento de Farmácia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Simeão
Camargo de Sá, 03. Guarapuava, PR. CEP 85040-080. Brazil.*

Running title: Prenatal stress produces social behavior deficits

***Corresponding author**

Marcelo Alves de Souza

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento

Rua Sarmiento Leite, 500

Porto Alegre, 90050-170, RS, Brazil

e-mail: tiflosoles@yahoo.com.br

Phone: +55 51-3308-3578

Fax: +55 51-3308-3656

Key words: Prenatal stress, cross-fostering, social memory, social interaction, oxytocin, vasopressin

ABSTRACT

The purpose of this study was to analyze the effects of repeated restraint stress on social behaviors in Wistar rats in adulthood when only the mothers and/or offspring were submitted to the prenatal stress protocol. Female Wistar rats were exposed to 30 min of restraint stress 4 times per day in the last 7 days of pregnancy. At birth, pups were cross-fostered and assigned to the following groups: prenatally non-stressed offspring raised by prenatally non-stressed mothers (NS:NS), prenatally non-stressed offspring raised by prenatally stressed mothers (S:NS), prenatally stressed offspring raised by prenatally non-stressed mothers (NS:S), prenatally stressed offspring raised by prenatally stressed mothers (S:S). As adults, male offspring underwent social recognition and interaction tests. The number of oxytocin (OT) and vasopressin (VP) neurons in the paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei of hypothalamus were analyzed. The results show that prenatal stress induced a decrease in social behaviors in the NS:S and S:S groups. Only the combination of prenatally stressed offspring with stressed mothers (S:S) exhibited increased anxiety and aggressive behavior. Social behavior deficits were more linked to a reduction in the number of VP-neurons than OT-neurons in the PVN. In conclusion, prenatal stress reduced social behavior in adult males. On the other hand, when applied exclusively to the mother, prenatal stress produced no effect. Morphologic changes produced by this intervention were more apparent in the vasopressinergic system than in the oxytocinergic system.

1. INTRODUCTION

The ability to recognize a familiar individual from unfamiliar ones, including the recognition of mother by offspring, mate recognition and the recognition of the dominant individual by a subordinate in a hierarchy, is the foundation for social relationships in all species [1, 2]

The neuropeptides oxytocin and vasopressin are thought to modulate social behavior in a variety of animal species and humans [3-6]. In rats, these neuropeptides exert different effects on aggressive [7], affiliative [8] and sexual behavior [9], besides influencing social interaction and social memory [10, 11].

Prenatal stress is an intervention that has been shown to produce changes in social behavior in humans and rodents in adulthood [12, 13], as well as induce hyperactivity [14], cognitive deficits [15, 16], anxiety [17, 18] and depression-like behaviors [19, 20]. Oxytocin and vasopressin are released both centrally and peripherally into the circulation. Magnocellular neurons of the paraventricular (PVN) and of the supraoptic nuclei from the hypothalamus release these peptides into the peripheral circulation, while it is secreted centrally by parvocellular neurons in the PVN and extra-hypothalamic sites [2].

The long-term changes in offspring caused by stress during pregnancy are also consequences of an indirect effect of maternal behavior, since it has been shown that prenatal stress decreases this behavior [21, 22]. Thus, the present study was designed to investigate the effects of prenatal stress on the social behavior (social interaction and social memory) of Wistar rats in adulthood. A cross-fostering procedure was adopted in order to separate the effects of prenatal stress on the fetuses from that of the behavior of the mother. In addition, the role of oxytocin and vasopressin in social behavior was

investigated based on the assumption that prenatal stress could induce stable morphological changes related to the peptidergic system.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Animals*

All experimental procedures were approved by the Research Ethics Committee of the *Universidade Federal do Rio Grande do Sul* (Nr. 2007907) and were in accordance with Brazilian legislation (*law 11.794/08*), the guidelines of the Brazilian Collegium of Animal Experimentation (COBEA) on the care and use of animals in research and teaching. Seventy virgin female Wistar rats were obtained from a breeding colony at *Universidade Federal do Rio Grande do Sul* (Porto Alegre, Brazil). They were maintained on a 12 h light-dark cycle (lights on at 6 a.m), at a room temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and relative humidity around 50% with water and food (Rodent chow, Nutrilab, Colombo, Brazil) freely available at all times.

The estrous cycle was checked daily by vaginal smear and once the proestrus phase was detected in at least 4 females, the animals were individually mated with a sexually experienced male for 24 hours in polycarbonate cages (24x20x47cm). The first day of pregnancy was confirmed by the presence of sperm in the vaginal smear up to 12 hours after mating.

2.2. *Prenatal stress procedure*

During the last days of pregnancy (days 15 to 21), females were submitted to four sessions of 30-min restraint stress each day (at 9:00, 12:00, 15:00 h during the light phase of the cycle, and 18:00 h during the dark phase). During these stress sessions, each rat was maintained in a 24x9x5cm Plexiglas restraint apparatus [21].

2.3. Cross-fostering

On the day of birth, pups were counted and culled to 8 pups per litter. Soon after that, the pups were cross-fostered according to the prenatal stress, and 4 groups were established:

1. Mothers that were not submitted to prenatal stress raising cross-fostered non-stressed pups (n=9, NS:NS)
2. Mothers that were not submitted to prenatal stress raising cross-fostered pups that were prenatally stressed (n=9, NS:S)
3. Prenatally stressed mothers raising cross-fostered non-stressed pups (n=9, S:NS)
4. Prenatally stressed mothers raising cross-fostered stressed pups (n=9, S:S)

In the present experiment, all pups were cross-fostered.

2.4. Elevated plus maze test

The elevated plus maze test is a well established and widely used method of testing anxiety-like behavior, in which rodents are exposed to a conflict situation between exploring open elevated arms and a natural tendency to hide in the closed arms [23,24]. The apparatus consists of an open platform in the center of an four-arm maze in which two opposite arms are open and two are enclosed (40 × 10cm), thus the structure resembles a plus sign (+). The entire maze is elevated 50 cm above the ground and placed in a quiet, dimly lit room. Adult rats from the four experimental groups (NS:NS; NS:S; S:NS and S:S) were placed individually in the center of the maze facing the closed arms and were observed for five minutes. The following parameters were measured: the number of entries into the open arms, time spent in the open arms, number of entries into the closed arms and time spent in the closed arms. All four paws

crossing into the arm defined an entry. Subsequently, the percentage of open arm entries and the percentage of time spent in the open arms with respect to total number of entries and total time i.e. 5 min were calculated.

2.5. Social memory test

The social recognition test (habituation–dishabituation) was based on a previous study [10, 25]. 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 that 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 (time T1 to T4) 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 (Time T5). 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 in sessions T1 to T4 was evaluated. Memory was investigated in the T5 session. In comparison with T4, 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 of the novel juvenile as exhibited towards the first juvenile introduced in T1.

2.6. Social interaction test

This test was also based on a previous study [10, 12]. 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 adult rats from the same experimental group. Therefore, 4 groups were observed: (NS:NS, NS:S, S:NS or S:S). 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 simultaneously, providing the opportunity for both rats to explore 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); 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, mounting or crawling under or over the other rat).

2.7. Tissue preparation and immunohistochemistry for OT and VP in the PVN and SON

After the behavioral test, rats were anesthetized with ketamine and xylazine (100mg/kg body weight, i.p., Cristália, São Paulo—SP, Brazil) and were transcardially perfused with saline solution and buffered 4% paraformaldehyde (pH7.4) using a peristaltic pump (30mL/min, Milan Equipamentos Científicos, Colombo—PR, Brazil). Brains were removed, post-fixed in the same fixative solution and cryoprotected in 15% and 30% sucrose in phosphate buffered saline (PBS). Briefly, serial sections (25 μ m each) with 100 μ m intervals were collected and stored at -20 ° C in anti-freezing solution. 8 slides per animal were used to perform immunohistochemistry using the peroxidase method. Initially, sections were washed in PBS, followed by a 30 min period with 3% hydrogen peroxide (H₂O₂). After several washes in PBS, sections were pre-incubated in 1% albumin solution (BSA) with 0.4% triton X-100 (PBS-Tx) 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 BSA. Tissues were then washed in PBS and incubated with antimouse IgG (Sigma-Aldrich, 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. After being washed in PBS, the slices were placed in peroxidase anti-peroxidase (1:500, Sigma-Aldrich, USA, P1291) for 1 h and 30 min. The immunohistochemical reaction was developed by incubating each slice in a medium containing 0.06% 3,3 diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich, USA, D5637) and then in the same solution containing 1 μ M of 3% H₂O₂ per mL of DAB medium for 10 min. Finally, the slices were rinsed in PBS, dehydrated with ethanol, cleared with xylene and covered with permount and coverslips. Control sections were prepared by omitting the primary antibody and replacing it with PBS. 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 a Nikon Microscope Optiphot-2 (Japan) coupled to a CMOS camera (518 CU, Micrometrics) and analyzed with Image J Software 1.42q. Cells were considered parvocellular when the cell body diameter was 6 to 12 μm , and magnocellular if larger than 13 μm . OT and VP-positive neurons were counted within the test-area in the PVN and SON in both hemispheres by a trained observer under 200 \times magnification. Data were expressed as mean (SEM) number of OT or VP-positive stained cells within a test-area of 184.112 μm^2 . 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) [26, 27].

2.8. Statistical analysis

Data were expressed as means (\pm SEM). The results of social interaction test, elevated plus maze and immunohistochemistry were compared between groups using one-way ANOVA, while repeated measures ANOVA was used for the social memory test. The differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Plus maze test

The elevated plus maze has been widely used as an ethologically relevant measure of anxiety because it is draws upon the rat's natural tendency to avoid open spaces and because anxiolytic drugs increase open arm time [28]. The data shows that only the prenatally stressed offspring raised by stressed mothers (S:S group) showed increased

levels of anxiety-like behavior compared with the NS:NS group, while for other groups no significant difference was found. This result is represented by the greater portion of time spent in the closed arms (one-way ANOVA $F_{(3,32)}=3.9$; $p=0.01$; followed by Newman-Keuls post hoc test) (Fig. 1A) and by the reduced portion of time spent in the open arms (one-way ANOVA $F_{(3,32)}=4.0$; $p=0.01$; followed by Newman-Keuls post hoc test) (Fig. 1B).

Fig. 1C illustrates a significant increase in the number of entries into the closed arms made by the S:S group compared to all groups (one-way ANOVA $F_{(3,32)}=6.1$; $p=0.002$; followed by Newman-Keuls post hoc test), while Fig. 1D shows a reduction in the number of entries into the open arms made by the S:S group compared to all groups (one-way ANOVA $F_{(3,32)}=6.1$; $p=0.002$; followed by Newman-Keuls post hoc test). For all other groups, no significant difference was found.

3.2. Social memory

Fig. 2A illustrates the length of the investigation time of the NS: NS group, where the investigation time (T5 time) was not reduced when compared to the T1 time, while with all the other times (T2; T3 and T4) there was a significant reduction in investigation compared to the T1 time (repeated measures ANOVA $F_{(4,32)}=8.1$; $p=0.0001$; followed by Newman-Keuls post hoc test). Fig. 2 B illustrates the length of the investigation time of the NS:S group, where all times (T2, T3, T4 and T5) were significantly different when compared to the T1 time (repeated measures ANOVA $F_{(4,32)}=11.3$; $p=0.002$; followed by Newman-Keuls post hoc test). Similarly to the NS:NS group, Fig. 2 C illustrates the length of the investigation time of the S:NS group, where only the T5 time showed no reduction when compared to the T1 time (repeated measures ANOVA $F_{(4,32)}=11.9$; $p=0.0001$; followed by Newman-Keuls post hoc test). Fig 2D illustrates the

length of the investigation time of the S:S group, where all the investigation times were significantly reduced when compared to the T1 time (repeated measures ANOVA $F_{(4,32)}=13.3$; $p=0.0001$; followed by Newman-Keuls post hoc test).

Fig. 3 illustrates the length of the investigation time of the four groups at T1 and T5. The data show that at T1, only the S:S group showed a significant reduction in the investigation time when compared to the NS:NS group (One-way ANOVA $F_{(3,32)}=3.5$; $p=0.02$; followed by Newman-Keuls post hoc test). At T5, only the NS:S and S:S groups showed a significant reduction in investigation time when compared to the NS:NS group, while no significant difference was found for the other groups (One-way ANOVA $F_{(3,32)}=7.2$; $p=0.0008$; followed by Newman-Keuls post hoc test).

3.3. Social interaction

Fig. 4A illustrates the latency to begin sniffing between pairs of adult rats of groups (NS: NS, NS: S, S: NS and S: S) in which no significant difference was detected (one-way ANOVA $F_{(3,28)}=1.6$; $p=0.2$). Fig.4B shows a difference in the length of time spent sniffing, where the S:S and NS:S groups exhibited a reduction when compared to the NS:NS group (one-way ANOVA $F_{(3,28)}=5.4$; $p=0.004$; followed by Newman-Keuls post hoc test). Regarding aggressive behavior, Fig. 4 C illustrates the latency to the first attack, showing a shorter latency for the NS:S and S:S groups when compared to the NS:NS group (one-way ANOVA $F_{(3,28)}=4.2$; $p=0.01$; followed by Newman-Keuls post hoc test). Fig. 4D illustrates an increase in the frequency of attacks for the S:S group when compared to all other groups (one-way ANOVA $F_{(3, 28)}=7.3$; $p=0.0005$; followed by Newman-Keuls post hoc test).

3.4. Immunohistochemistry for OT and VP

Fig. 5 A illustrates the number of OT-immunoreactive neurons in the PVN of adult males. In the PVN, only the S:S group showed a reduced number of OT-magnocellular neurons when compared to the other groups (one-way ANOVA $F_{(3, 16)} = 4.4$; $p = 0.01$; followed by Newman-Keuls post hoc test). Fig. 5 B illustrates the number of OT-parvocellular neurons in the PVN, while Fig. 5 C illustrates the number of OT-neurons in the SON. Here, no significant difference was detected between the groups (one-way ANOVA $F_{(3, 16)} = 0.5$, $F_{(3, 16)} = 0.8$; respectively).

Fig. 5 D illustrates the number of VP-immunoreactive neurons in the PVN of adult males. In the PVN, both the NS:S and S:S groups showed a reduction in the number of VP-magnocellular neurons when compared with the NS:NS group (one-way ANOVA $F_{(3, 16)} = 19.0$; $p < 0.0001$; followed by Newman-Keuls post hoc test). Fig. 5 E shows the number of VP-parvocellular neurons that was analyzed in the PVN. Here, only the S:S group showed a decrease in the number of cells compared with the NS:NS group (one-way ANOVA $F_{(3, 16)} = 5.0$; $p = 0.01$; followed by Newman-Keuls post hoc test). The number of VP-neurons in the SON of adult females is also shown in Fig. 5F, although no significant difference was detected between the groups (one-way ANOVA $F_{(3, 16)} = 0.9$; $p = 0.4$).

Fig. 6 and 7 contains photomicrographs of representative PVN and SON slides from male rats belonging to the NS:NS; NS:S; S:NS and S:S groups processed for OT and VP immunohistochemistry.

DISCUSSION

The study analyzed the long-lasting effects of the combination of pre and post natal stress in adult male rats. A cross-fostering protocol was used in order to separate the effects of prenatal stress and postnatal environment on the offspring. However, this

procedure may have influenced the results obtained, since this procedure *per se* is known to increase the maternal care in lactating rats [29]. In the present study, prenatally stressed offspring raised both by stressed mothers (S:S group) and non-stressed ones (NS:S group) showed impaired intruder recognition during the social memory test. Both groups also exhibited differences in terms of social interaction, since they spent less time sniffing the other animal from the same experimental group when compared to the non-stressed pups raised by non-stressed mothers group (NS:NS). The latency to the first attack was also increased in the S:S and NS:S groups, but only the combination of prenatally stressed mothers and prenatally stressed offspring increased the attack frequency. In the elevated plus-maze, S:S animals showed higher levels of anxiety, remaining most of the time in the closed arms. Morphological analysis revealed a reduced number of OT-positive magnocellular neurons in the PVN of the S:S group, while VP-positive neurons from the same region decreased in the NS:S and S:S groups. In addition, only the S:S group exhibited a reduction in the parvocellular VP-positive neurons in the PVN.

Memory function was found to be affected in the offspring of mothers that were stressed during gestation. As previously described, restraint stress during the last week of pregnancy impairs spatial learning in the Morris water maze paradigm in males [30]. Unpredictable prenatal stress decreases memory for novel objects and novel spatial locations in adult males [31]. Regarding social memory, the S:S and NS:S groups exhibited a deficit in the habituation-dishabituation test, as evidenced by the lack of increase in the sniffing behavior when a novel conspecific intruder was inserted during the last exposure (T5). However, it was unclear if animals from the S:S group exhibited a deficit only in the social learning or if they presented a reduced social motivation,

since these animals had previously also shown disinterest in investigating the intruder during the first exposure (T1).

Memory and recognition were inferred from the social memory test, while social motivation was more specifically evaluated based on the amount of time spent in social non-aggressive contact in the social interaction test [32]. As expected, animals from the S:S group spent less time sniffing their pair in the social interaction test. In addition, the NS:S group were found to spend less time engaged in sniffing behavior, indicating that the care provided by non-stressed mothers was insufficient to reverse this deficit to engage in social behavior. Increased levels of glucocorticoids produced by pregnant animals when they were submitted to prenatal stress may reach the fetus through the placental circulation [21, 33] and be responsible for the social impairments seen in the interaction test [34]. Although we did not measure the corticosterone levels of these animals, previous studies have found social interaction deficits in prenatally stressed males with increased basal plasma corticosterone, ACTH and hypothalamic noradrenaline concentration after prenatal stress [35].

Some authors consider a reduction in social behaviors as a measure of high anxiety [13]. The S:S group remained more time in the closed arms of the elevated plus-maze, and therefore may be considered more anxious than the other animal groups in the study. However, this does not seem to be the cause for the decrease in social interaction, since higher levels of anxiety were not found in the NS:S group. Males submitted to an acute stress session with a natural predator (presence of a cat) in the 10th and 19th gestational day showed increased levels of anxiety, but a reduced attack frequency was also reported in these animals [12]. During the social interaction test, the NS:S and S:S groups showed shorter first attack latency and an increase in the attack frequency was also seen in the S:S group. The discrepancies found between our results and those of the

previous cited study may be related to the differences in the stress protocol adopted. Using a similar stress protocol, Del Cerro and cols [22] demonstrated more numerous attacks directed at neonatal pups in nulliparous stressed females raised by stressed mothers. Thus, restraint stress, when applied during the last week of pregnancy, appears to increase the aggressive behavior in adulthood.

Oxytocin and vasopressin play important roles in the brain by both facilitating conspecific social recognition and modulating subsequent behavioral responses [36-38]. In our study, prenatal stress did not influence the number of OT-positive parvocellular neurons in the PVN and SON. A decrease in the number of OT-positive magnocellular neurons was only seen in the PVN of the S:S group. According to Lee and cols [13], unpredictable prenatal stress led to reduced social interaction and decreased OT-mRNA in the PVN of young males. It is unclear whether the OT-mRNA was derived from parvocellular or magnocellular neurons. Both central and peripheral administration of OT have been reported to have complex effects in the rat [39] with either facilitated or attenuated social recognition being found depending on the administered dose [1]. Our results also showed that prenatal stress reduced the number of VP-positive magnocellular cells in the PVN of the NS:S and S:S groups, while only the S:S group exhibited a decrease in the number of VP-positive parvocellular cells in the same nuclei. The reduction in the number of magnocellular cells in the above cited groups may be involved in the social memory deficits observed in the current study, since peripheral administration of VP, VP analogs and selected VP metabolites were shown to be effective in enhancing social recognition [40, 41]. It was clear that when both aversive conditions coexisted, prenatally stressed mothers which probably presented altered maternal behavior [21] and prenatally stressed offspring, there was a greater impact on anxiety, aggressiveness and social behavior. If we assume that the decrease in the

number of VP-positive parvocellular neurons is related to reduced levels of VP secretion, it can be inferred that the behavioral deficits found in the S:S group may be related to central VP secretion.

In summary, repeated restraint stress during pregnancy reduced both social memory (habituation and dishabituation paradigm) and social interaction. Only the combination of prenatal stress and altered maternal care increased anxiety-like behavior and aggressive behavior. Importantly, prenatally non-stressed offspring raised by prenatally stressed mother (S:NS) did not show behavioral impairments. It is likely that adult male social behavior was not affected by the altered maternal care produced by restraint stress [21]. The reduced number of VP-positive neurons may be responsible for the important behavioral deficits found, while OT seems to be less involved according to our findings. Thus, special attention should be given to the gestational period, since stressful events during this time may be related to the emergence of behavioral impairments in adulthood.

Acknowledgments

This study was supported by grants from CNPq, FAPESP, FAPERGS and CAPES. There was no conflict of interests.

FIGURE CAPTIONS

Fig 1. Effects of prenatal stress on the plus maze test in adult rats. Data are shown as mean \pm (SEM) of the percentage of time and number of entries. **A – B** show the fraction of time spent in the closed arms and open arms, while, **C - D** show the fraction of the number of closed arm entries and open arm entries, respectively. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls post hoc test. * $p < 0.05$ (n=9 per group).

Fig 2. Effects of prenatal stress on the social recognition test (habituation–dishabituation paradigm) in male adult rats. Social investigation time (mean \pm SEM) in 4 repeated 2- min exposures to the same juvenile (T1–T4) followed by 1 final 2-min exposure to a different juvenile (T5) with an inter-trial interval of 18 min was compared in each group; **A-** (NS:NS); **B -** (NS:S); **C-** (S:NS); **D-** (S:S). Data were analyzed using one-way ANOVA with time as the repeated measure. * $p < 0.05$ (n = 9 per group).

Fig.3. Total duration of first investigation of the familiar juvenile (T1) and of the last investigation of the unfamiliar juvenile (T5) in the social recognition test (habituation–dishabituation paradigm). Data are shown as mean \pm (SEM) and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls post hoc test. * $p < 0.05$.

Fig 4. Effects of prenatal stress on the social interaction test in male adult rats. Data are shown as mean \pm (SEM). **A -** First sniffing latency; **B -** Total duration of sniffing the partner; **C -** First attack latency and **D -** frequency of attacks on partner. Data were

analyzed using one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls post hoc test. * $p < 0.05$. (n=8 per group).

Fig 5. Effects of prenatal stress on the number of positive oxytocin (OT) and vasopressin (VP) - immunostained cells in the parvocellular (pPVN) and magnocellular (mPVN) regions of the PVN and the SON in male rats at 90 days of age. The number of cells in the test-area ($184.112 \mu\text{m}^2$) was analyzed as mean \pm (SEM) across the sections of the nuclei (one out of every two sections). Results were compared between the groups (NS:NS, NS:S, S:NS and S:S) using one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls post hoc test. * $p < 0.05$. (n=5 per group).

Fig. 6. Representative photomicrographs of OT positive cell in the PVN and SON respectively. (A and B) NS:NS; (C and D) NS:S; (E and F) S:NS; (G and H) S:S; P - parvocellular immunostained neuron; arrow - magnocellular immunostained neuron; 3V - third ventricle. Magnification – 200X. Scale bar – 50 μm .

Fig. 7. Representative photomicrographs of VP positive cell in the PVN and SON, respectively. (A and B) NS:NS; (C and D) NS:S; (E and F) S:NS; (G and H) S:S; P - parvocellular immunostained neuron; arrow - magnocellular immunostained neuron; 3V - third ventricle. Magnification – 200X. Scale bar – 50 μm .

Figure 1

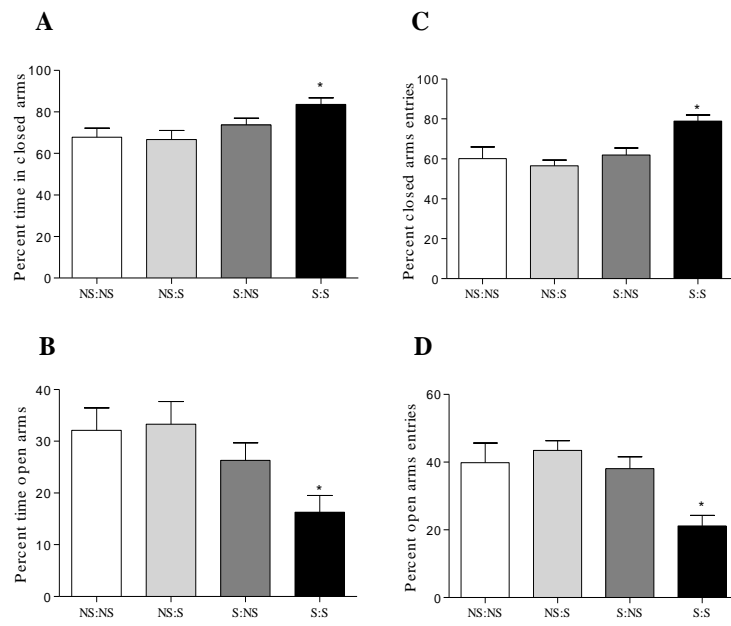


Figure 2

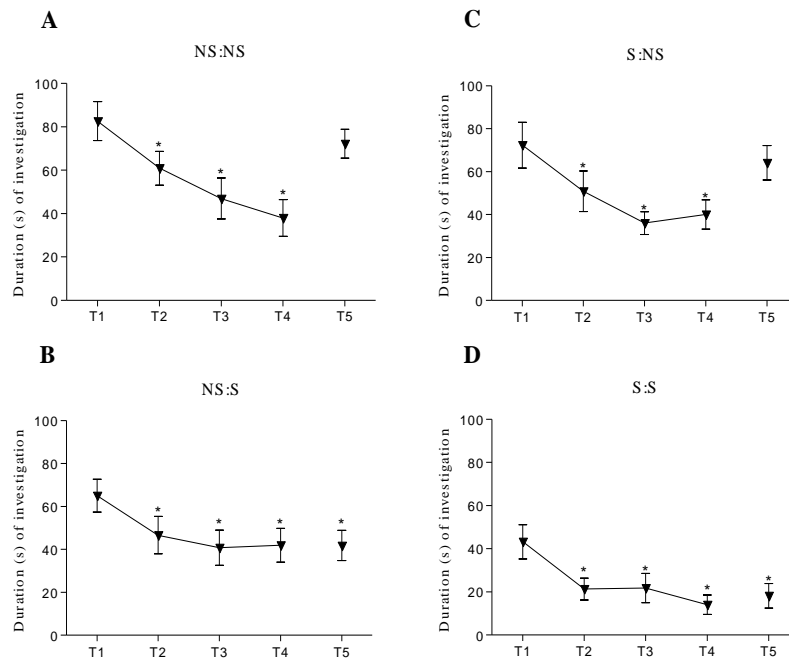


Figure 3

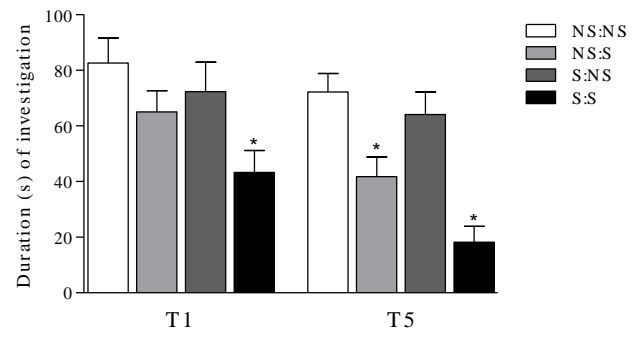


Figure 4

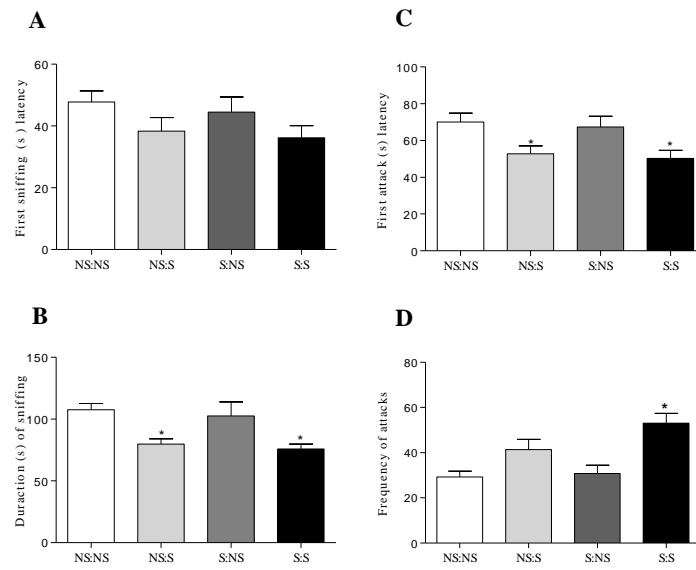


Figure 5

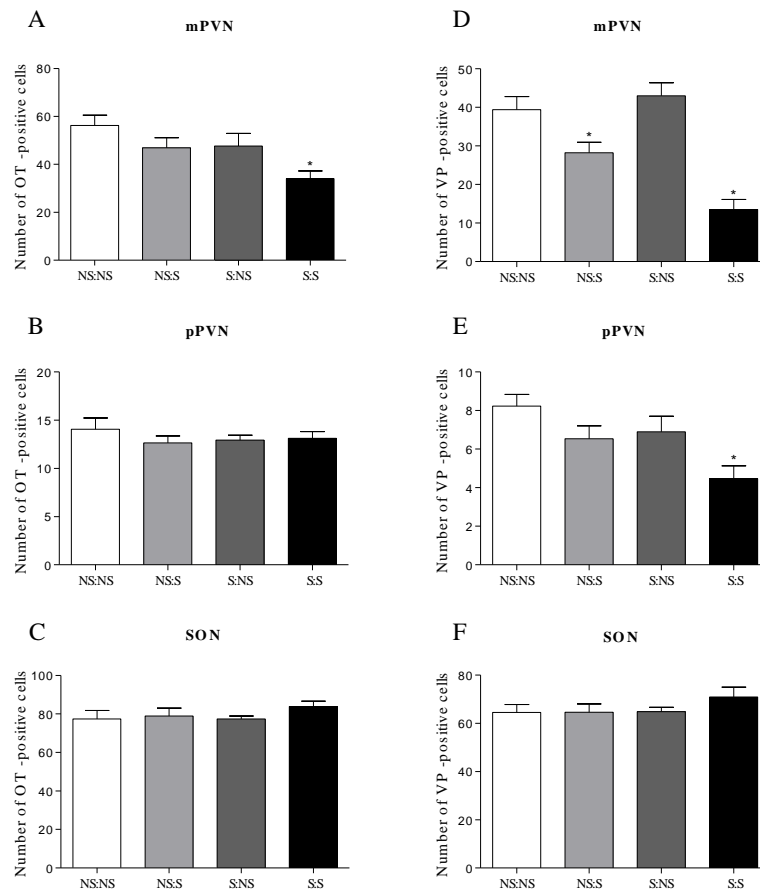


Figure 6

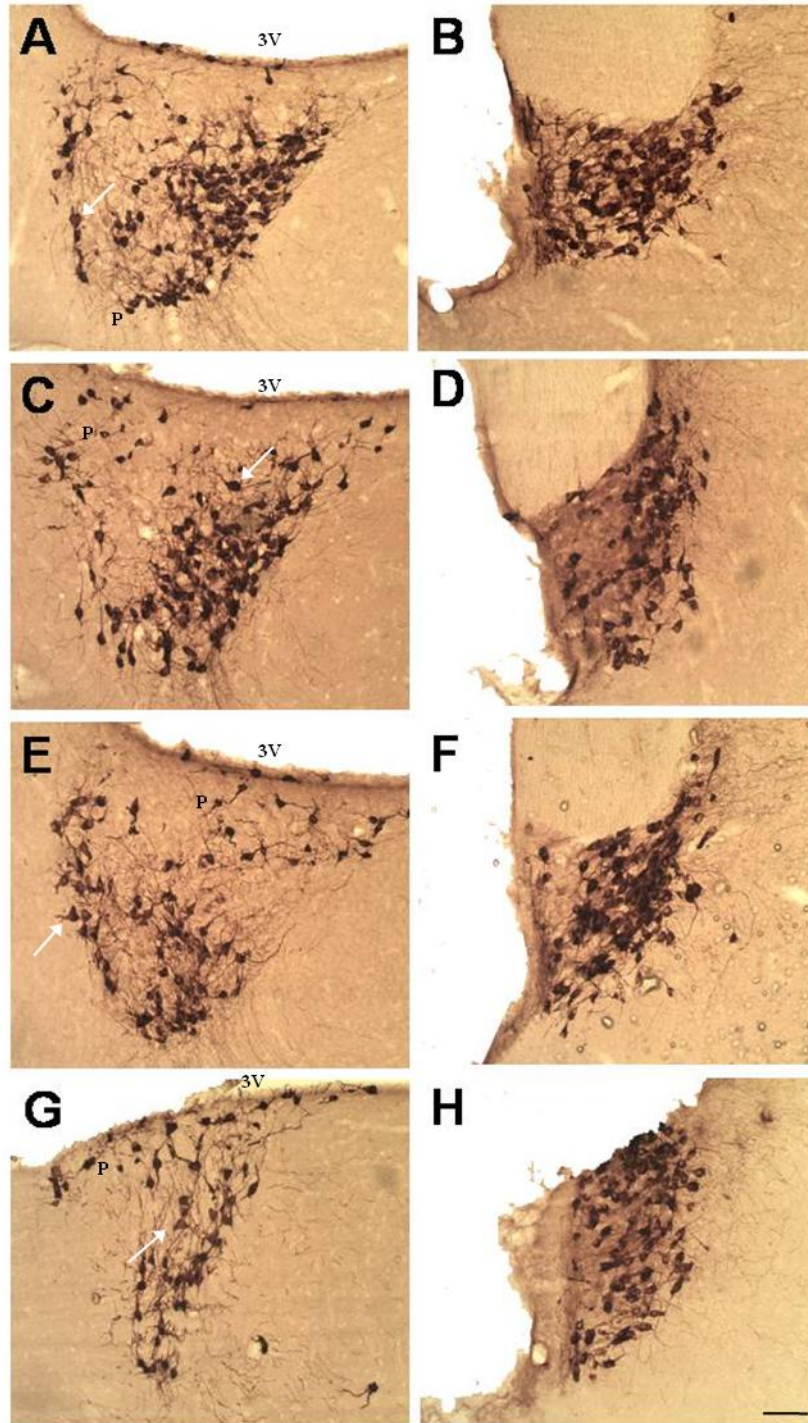
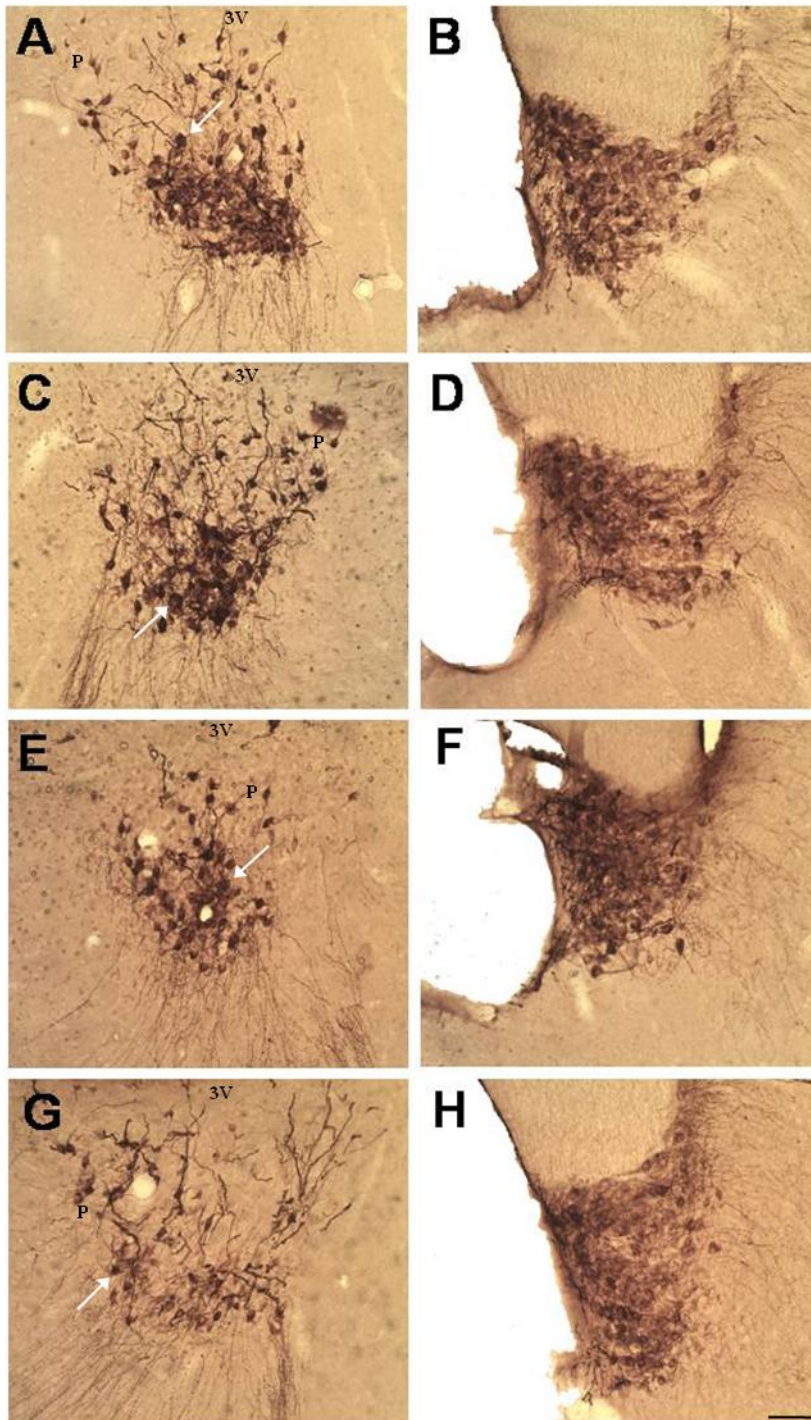


Figure 7



REFERENCES

- [1] Ferguson JN, Young LJ, Insel TR. The neuroendocrine basis of social recognition. *Front Neuroendocrinol* 2002;23:200-24.
- [2] Bielsky IF, Young LJ. Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides* 2004;25:1565-74.
- [3] Godwin J. Neuroendocrinology of sexual plasticity in teleost fishes. *Front Neuroendocrinol* 2010;31:203-16.
- [4] Rose JD, Moore FL. Behavioral neuroendocrinology of vasotocin and vasopressin and the sensorimotor processing hypothesis. *Front Neuroendocrinol* 2002;23:317-41.
- [5] Goodson JL, Thompson RR. Nonapeptide mechanisms of social cognition, behavior and species-specific social systems. *Curr Opin Neurobiol* 2010;20:784-94.
- [6] Young KA, Gobrogge KL, Liu Y, Wang Z. The neurobiology of pair bonding: insights from a socially monogamous rodent. *Front Neuroendocrinol* 2011;32:53-69.
- [7] Bosch OJ, Meddle SL, Beiderbeck DI, Douglas AJ, Neumann ID. Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety. *J Neurosci* 2005;25:6807-15.
- [8] Goodson JL, Schrock SE, Klatt JD, Kabelik D, Kingsbury MA. Mesotocin and nonapeptide receptors promote estrildid flocking behavior. *Science* 2009;325:862-6.

- [9] Winslow JT, Hastings N, Carter CS, Harbaugh CR, Insel TR. A role for central vasopressin in pair bonding in monogamous prairie voles. *Nature* 1993;365:545-8.
- [10] Todeschin AS, Winkelmann-Duarte EC, Jacob MH, Aranda BC, Jacobs S, Fernandes MC, et al. Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Horm Behav* 2009;56:93-100.
- [11] Tobin VA, Hashimoto H, Wacker DW, Takayanagi Y, Langnaese K, Caquineau C, et al. An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition. *Nature* 2010;464:413-7.
- [12] Patin V, Lordi B, Vincent A, Caston J. Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. *Brain Res Dev Brain Res* 2005;160:265-74.
- [13] Lee PR, Brady DL, Shapiro RA, Dorsa DM, Koenig JI. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Res* 2007;1156:152-67.
- [14] Weller A, Glaubman H, Yehuda S, Caspy T, Ben-Uria Y. Acute and repeated gestational stress affect offspring learning and activity in rats. *Physiol Behav* 1988;43:139-43.
- [15] Grimm VE, Frieder B. The effects of mild maternal stress during pregnancy on the behavior of rat pups. *Int J Neurosci* 1987;35:65-72.
- [16] Smith BL, Wills G, Naylor D. The effects of prenatal stress on rat offsprings' learning ability. *J Psychol* 1981;107:45-51.
- [17] Dickerson PA, Lally BE, Gunnel E, Birkle DL, Salm AK. Early emergence of increased fearful behavior in prenatally stressed rats. *Physiol Behav* 2005;86:586-93.

- [18] Ward HE, Johnson EA, Salm AK, Birkle DL. Effects of prenatal stress on defensive withdrawal behavior and corticotropin releasing factor systems in rat brain. *Physiol Behav* 2000;70:359-66.
- [19] Morley-Fletcher S, Darnaudery M, Koehl M, Casolini P, Van Reeth O, Maccari S. Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test. Effects of a chronic treatment with tianeptine. *Brain Res* 2003;989:246-51.
- [20] Poltyrev T, Gorodetsky E, Bejar C, Schorer-Apelbaum D, Weinstock M. Effect of chronic treatment with ladostigil (TV-3326) on anxiogenic and depressive-like behaviour and on activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male and female prenatally stressed rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;181:118-25.
- [21] de Souza MA, Szawka RE, Centenaro LA, Diehl LA, Lucion AB. Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. *Physiol Behav* 2011;105:850-5.
- [22] Del Cerro MC, Perez-Laso C, Ortega E, Martin JL, Gomez F, Perez-Izquierdo MA, et al. Maternal care counteracts behavioral effects of prenatal environmental stress in female rats. *Behav Brain Res* 2010;208:593-602.
- [23] Mechiel Korte S, De Boer SF. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *European Journal of Pharmacology* 2003;463:163-75.
- [24] Bhattacharya SK, Satyan KS. Experimental methods for evaluation of psychotropic agents in rodents: I--Anti-anxiety agents. *Indian J Exp Biol* 1997;35:565-75.

- [25] Winslow JT, Camacho F. Cholinergic modulation of a decrement in social investigation following repeated contacts between mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;121:164-72.
- [26] Winkelmann-Duarte EC, Todeschin AS, Fernandes MC, Bittencourt LC, Pereira GA, Samios VN, et al. Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. *Brain Res* 2007;1170:20-30.
- [27] Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003;75:469-86.
- [28] Hogg S. A review of the validity and variability of the Elevated Plus-Maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1996;54:21-30.
- [29] Maccari S, Piazza PV, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, Le Moal M. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J Neurosci* 1995;15:110-6.
- [30] Szuran TF, Pliška V, Pokorný J, Welzl H. Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiology & Behavior* 71:353-62.
- [31] Schulz KM, Pearson JN, Neeley EW, Berger R, Leonard S, Adams CE, et al. Maternal stress during pregnancy causes sex-specific alterations in offspring memory performance, social interactions, indices of anxiety, and body mass. *Physiology & Behavior* 2011;104:340-7.
- [32] Lim MM, Young LJ. Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. *Horm Behav* 2006;50:506-17.
- [33] Welberg LA, Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol* 2001;13:113-28.

- [34] Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2008;32:1073-86.
- [35] Gotz AA, Stefanski V. Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum corticosterone, blood immune parameters and anxiety behaviour in adult male rat offspring. *Physiol Behav* 2007;90:108-15.
- [36] Veenema AH. Toward understanding how early-life social experiences alter oxytocin- and vasopressin-regulated social behaviors. *Horm Behav* 2011.
- [37] Wacker DW, Ludwig M. Vasopressin, oxytocin, and social odor recognition. *Horm Behav* 2011.
- [38] Storm EE, Tecott LH. Social circuits: peptidergic regulation of mammalian social behavior. *Neuron* 2005;47:483-6.
- [39] Popik P, Vetulani J. Opposite action of oxytocin and its peptide antagonists on social memory in rats. *Neuropeptides* 1991;18:23-7.
- [40] Popik P, Van Ree JM. Long-term facilitation of social recognition in rats by vasopressin related peptides: a structure-activity study. *Life Sci* 1992;50:567-72.
- [41] Popik P, Wolterink G, De Brabander H, van Ree JM. Neuropeptides related to [Arg8]vasopressin facilitates social recognition in rats. *Physiol Behav* 1991;49:1031-5.

7. DISCUSSÃO GERAL

Em humanos e roedores, eventos estressores durante a gestação tem sido ligado a alterações comportamentais na prole na idade adulta (KOFMAN, 2002; TALGE et al., 2007). Na maioria dos estudos, as repercussões relacionadas a essa intervenção são atribuídas principalmente aos seus efeitos *per se*, os quais aumentam os níveis de glicocorticóides na circulação das mães e alcançam o feto através da placenta. Entretanto, estudos têm mostrado que os efeitos do estresse pré-natal sobre os filhotes podem ser decorrentes de mudanças ocorridas no ambiente pós-natal, mais especificamente relacionadas a alterações do comportamento materno (DEL CERRO et al., 2010). Apesar de alguns estudos mostrarem prejuízos no cuidado maternal devido ao estresse durante a gestação (SMITH et al., 2004; BOSCH et al., 2007), o uso de protocolos variados de estresse pré-natal aliado aos diferentes períodos de intervenção e avaliação do comportamento materno, contribui para o fato de que existam resultados contraditórios na literatura (PARDOM et al., 2000). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar o comportamento de filhotes adultos e neonatos quando somente as mães e/ou os filhotes foram submetidos ao protocolo de estresse pré-natal. Com o intuito de separar os efeitos do estresse aplicado sobre a mãe daquele infringido sobre os filhotes, foi utilizado o procedimento de adoção cruzada.

Nossos resultados mostraram que o estresse pré-natal por contenção realizado de forma repetida reduziu o contato mãe-filhote, como observado pela diminuição no número de lambidas e da permanência da mãe no ninho. Além disso, essa intervenção foi capaz de aumentar os níveis de glicocorticóides nas prenhas no 15º dia gestacional, agindo realmente como estímulo estressor. Esses resultados apontam para um importante envolvimento desses hormônios com a redução do comportamento materno. Estudos prévios mostram que os glicocorticóides podem regular a expressão de receptores de ocitocina (PATCHEV et al., 1993; LIBERZON et al., 1997), os quais estão

envolvidos no surgimento do cuidado maternal em ratas lactantes. Todavia, esses receptores não foram avaliados no presente estudo.

O estresse pré-natal produziu um efeito sexo específico no teste de preferência ao odor do ninho em filhotes neonatos. Filhotes fêmeas mostraram ser mais sensíveis aos efeitos de intervenções perinatais em comparação aos filhotes machos, uma vez que as fêmeas do grupo NS:S e S:NS exibiram prejuízos neste teste. Somente a combinação do estresse pré-natal e a redução no cuidado maternal (S:S) afetaram a preferência ao odor do ninho em filhotes machos. Um prévio estudo já mostrou que ratas lactantes naturalmente interagem mais com filhotes machos do que com filhotes fêmeas (MOORE et al., 1997). Assim, as ratas prenhas submetidas ao estresse pré-natal podem ter reduzido ainda mais seus cuidados direcionados aos filhotes fêmeas, uma hipótese que explicaria a maior vulnerabilidade das fêmeas aos efeitos do estresse pré-natal. Entretanto, devido as fêmeas do grupo NS:S também apresentarem prejuízos comportamentais, postulamos que filhotes fêmeas talvez sejam mais sensíveis a qualquer tipo de intervenção estressora, tanto pré quanto pós-natal.

Como a NA está envolvida na preferência ao odor do ninho, mudanças significativas no conteúdo de NA do BO nos filhotes de 7 dias que exibiram déficits nesse comportamento eram esperados. Entretanto, nenhuma alteração no conteúdo desse neurotransmissor foi encontrada nessa estrutura. A ausência de uma alteração sobre sistema noradrenérgico pode ter ocorrido devido a dois motivos: (1) pode ter ocorrido que produção desse neurotransmissor não tenha sido mantida constante nessa fase, e que a combinação de ambos os fatores, estresse pré-natal e redução do cuidado maternal tenha produzido um efeito acumulativo, o qual pode ter alterado os níveis desse neurotransmissor durante os primeiros dias e depois ter se igualado ao nível dos controles no sétimo dia; (2) outro fator importante a ser considerado é a influência do

protocolo de adoção utilizado. É possível que esse procedimento possa ter influenciado de alguma maneira os resultados obtidos no BO dos filhotes, uma vez que esse procedimento per se só tem demonstrado afetar o cuidado materno.

As experiências olfatórias durante as fases iniciais do desenvolvimento possuem seu valor e são importantes para a expressão de certos comportamentos na idade adulta (MORICEAU & SULLIVAN, 2005). No presente estudo, repercussões do estresse pré-natal associado ao cuidado maternal reduzido em filhotes também foram observadas na idade adulta. Machos do grupo S:S apresentaram maiores disfunções comportamentais ligadas a ansiedade, agressividade, comportamentos sociais e alterações morfológicas dos sistema ocitocinérgico e vasopressinérgico. Tais prejuízos parecem estar mais relacionados aos efeitos das intervenções pré-natais do que pós-natais, uma vez que o grupo NS:S apresentou semelhantes déficits comportamentais. É provável que os efeitos do estresse pré-natal observados na idade adulta não tenham sido atenuados pelo comportamento das mães que não foram submetidas ao estresse pré-natal. Em contrapartida, a restauração de um ambiente pós-natal favoreceu o reconhecimento do odor do próprio ninho em filhotes de 7 dias de idade, pois os animais do grupo NS:S foram capazes de distinguir perfeitamente o cheiro do próprio ninho. Assim, o cuidado maternal durante os primeiros dias pós-natais, pode minimizar os efeitos do estresse pré-natal apenas a curto prazo, enquanto seus efeitos a longo prazo são mantidos.

Além das conseqüências sobre os comportamentos sociais na idade adulta (S:S), o estresse pré-natal induziu a alterações no número de neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos no PVN. Devido a ocitocina periférica ser pouco permeável a barreira hematoencefálica (FERGUSON et al., 2002), a redução no número de células magnocelulares parece estar menos ligada a esses déficits comportamentais nos animais adultos. Em contrapartida, o envolvimento do sistema vasopressinérgico se torna mais

claro, pois somente os machos do grupo S:S exibiram uma redução no número de neurônios parvocelulares do PVN. Através desses resultados, é possível inferir que os prejuízos nos comportamentos sociais verificados nesse estudo estão mais relacionados o sistema vasopressinérgico do que com o ocitocinérgico.

Por fim, os períodos que antecedem o parto e o ambiente pós-natal no início da vida, merecem uma atenção especial. Eles compreendem fases críticas para o desenvolvimento do animal sendo responsáveis por determinar a expressão de padrões comportamentais na infância e idade adulta. Contudo, intervenções durante esses períodos resultam em déficits comportamentais que podem possivelmente ser atenuados durante as fases iniciais, mas podem ser expressos durante a idade adulta.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nessa tese permitem concluir que:

- O estresse por contenção realizado de forma repetida durante a última semana de gestação foi efetivo como estímulo estressor, aumentando os níveis de corticosterona em ratas prenhas. Além disso, durante a primeira semana pós-parto essa intervenção foi capaz diminuir o número de lambidas nos filhotes e aumentar a ausência das mães do próprio ninho;
- Quando as intervenções foram combinadas, estresse pré-natal e cuidado maternal reduzido, filhotes de ambos os sexos mostraram não distinguir o odor do próprio ninho. Todavia, foram observadas diferenças sexuais. Filhotes fêmeas mostraram ser menos resistentes aos efeitos das intervenções perinatais comparado aos filhotes machos. Além disso, a atividade noradrenérgica BO de filhotes machos e fêmeas não foi alterada pelos efeitos do estresse pré-natal;
- Semelhante a ratos neonatos, machos adultos quando estressados prenatalmente e criados por mães estressadas no período pré-natal e, filhotes estressados criados por mães não estressadas produziram déficits nos comportamentos de reconhecimento e interação social. Isso mostra que os efeitos do ambiente pós-natal não foram capazes de atenuar os efeitos do estresse pré-natal sobre os comportamentos sociais na idade adulta.
- As alterações morfológicas envolvendo OT e VP no PVN e déficits nos comportamentos sociais foram mais evidentes quando filhotes estressados prenatalmente foram criados por mães também estressadas durante a gestação (S:S). Possivelmente, as alterações dos comportamentais sociais foram mais ligadas ao sistema

vasopressinérgico do que ocitocinérgico, uma vez que o número de células parvocelulares responsáveis pela secreção central da VP foi reduzido nesse grupo.

➤ As alterações do ambiente pré quanto pós-natal são fatores que realmente comprometem a expressão de comportamentos iniciais e comportamentos futuros. Além disso, intervenções que ocorrem sobre os filhotes durante o período gestacional podem ser reforçadas através do comportamento materno. Todavia, mais estudos são necessários para tentar esclarecer quais são os possíveis mecanismos relacionados com as alterações produzidas pelo estresse pré-natal sobre os filhotes quando associado às alterações do ambiente pós-natal.

Perspectivas futuras:

➤ Avaliar a densidade de receptores para OT na APOM de ratas lactantes não submetidas ao estresse por contenção e submetidas ao protocolo de estresse por contenção pela técnica de imunohistoquímica;

➤ Verificar a atividade de outros neurotransmissores como 5-HT e DA no BO dos filhotes neonatos dos quatro grupos experimentais através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);

➤ Caracterizar a atividade neuronal do LC e BO em filhotes de sete dias de idade através da expressão da proteína c-fos pela técnica de imunohistoquímica após o teste de preferência ao odor do ninho nos quatro grupos experimentais;

- Avaliar a densidade de receptores α e β adrenérgicos no BO dos filhotes após o teste de preferência ao odor do ninho em filhotes machos e fêmeas de sete dias de idade dos 4 grupos experimentais;
- Avaliar a atividade noradrenérgica basal no BO de filhotes machos e fêmeas de 7 dias de idade antes do teste de preferência olfatória;
- Verificar a expressão de receptores para OT e VP no BO de ratos machos na idade adulta dos quatro grupos experimentais;
- Verificar a atividade neuronal no BO de machos adultos dos quatro grupos experimentais através da expressão da proteína c-fos pela técnica de imunohistoquímica.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H., HIDAKA, N., KAWAGOE, C., ODAGIRI, K., WATANABE, Y., IKEDA, T., ISHIZUKA, Y., HASHIGUCHI, H., TAKEDA, R., NISHIMORI, T., ISHIDA, Y. Prenatal psychological stress causes higher emotionality, depression-like behavior, and elevated activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neurosci Res.* 59, 145-51, 2007.

BARBAZANGES, A., PIAZZA, P.V., LE MOAL, M., MACCARI, S. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J Neurosci.* 16, 3943-9, 1996.

BARROS, V.G., RODRIGUEZ, P., MARTIJENA, I.D., PEREZ, A., MOLINA, V.A., ANTONELLI, M.C. Prenatal stress and early adoption effects on benzodiazepine receptors and anxiogenic behavior in the adult rat brain. *Synapse.* 60, 609-618, 2006.

BEN-BARAK, Y., RUSSELL, J.T., WHITNALL, M.H., OZATO, K., GAINER, H. Neurophysin in the hypothalamo-neurohypophysial system. I. Production and characterization of monoclonal antibodies. *J Neurosci.* 5, 81-97, 1985.

BENELLI, A., BERTOLINI, A., POGGIOLI, R., MENOZZI, B., BASAGLIA, R., ARLETTI, R.. Polymodal dose-response curve for oxytocin in the social recognition test. *Neuropeptides.* 28, 251-5, 1995.

BEVERSDORF, D.Q., MANNING, S.E., HILLIER, A., ANDERSON, S.L., NORDGREN, R.E., WALTERS, S.E., NAGARAJA, H.N., COOLEY, W.C., GAELIC, S.E., BAUMAN, M.L. Timing of prenatal stressors and autism. *J Autism Dev Disord.* 35, 471-8, 2005.

BHATTACHARYA, S.K., SATYAN, K.S. Experimental methods for evaluation of psychotropic agents in rodents: I--Anti-anxiety agents. *Indian J Exp Biol.* 35, 565-75, 1997

BIELSKY, I.F., YOUNG, L.J. Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides*. 25, 1565-74, 2004.

BOCCIA, M.L., PEDERSEN, C.A.,. Brief vs. long maternal separations in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior and lactation levels of aggression and anxiety. *Psychoneuroendocrinology*. 26, 657-72, 2001.

BOSCH, O.J., MEDDLE, S.L., BEIDERBECK, D.I., DOUGLAS, A.J., NEUMANN, I.D. Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety. *J Neurosci*. 25, 6807-15, 2005.

BOSCH, O.J., MUSCH, W., BREDEWOLD, R., SLATTERY, D.A., NEUMANN, I.D. Prenatal stress increases HPA axis activity and impairs maternal care in lactating female offspring: implications for postpartum mood disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 32, 267-78, 2007a.

BOSCH, O.J., MUSCH, W., BREDEWOLD, R., SLATTERY, D.A., NEUMANN, I.D. Prenatal stress increases HPA axis activity and impairs maternal care in lactating female offspring: Implications for postpartum mood disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 32, 267-278, 2007b.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248-54, 1976.

BRAYDEN, R.M., ALTEMEIER, W.A., TUCKER, D.D., DIETRICH, M.S., VIETZE, P. ANTECEDENTS OF CHILD NEGLECT IN THE 1ST 2 YEARS OF LIFE. *Journal of Pediatrics*. 120, 426-429, 1992.

CALDJI, C., DIORIO, J., MEANEY, M.J. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biol Psychiatry*. 48, 1164-74, 2000.

- CALDWELL, H.K., LEE, H.J., MACBETH, A.H., YOUNG, W.S. Vasopressin: behavioral roles of an "original" neuropeptide. *Prog Neurobiol.* 84, 1-24, 3rd, 2008.
- CHAMPAGNE, F.A., FRANCIS, D.D., MAR, A., MEANEY, M.J. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav.* 79, 359-71, 2003.
- CHAMPAGNE, F.A., MEANEY, M.J. Stress during gestation alters postpartum maternal care and the development of the offspring in a rodent model. *Biol Psychiatry.* 59, 1227-35, 2006.
- CHAMPAGNE, F.A. Maternal imprints and the origins of variation. *Horm Behav.* 60, 4-11, 2011.
- CHOLERIS, E., KAVALIERS, M., PFAFF, D.W. Functional genomics of social recognition. *J Neuroendocrinol.* 16, 383-9, 2004.
- DARNAUDERY, M., MACCARI, S., Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Research Reviews.* 57, 571-85, 2008a.
- DARNAUDERY, M., MACCARI, S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Res Rev.* 57, 571-85, 2008b.
- DE SOUZA, M.A., SZAWKA, R.E., CENTENARO, L.A., DIEHL, L.A., LUCION, A.B. Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. *Physiol Behav.* 105, 850-55, 2011.
- DE VRIES, G.J., MILLER, M.A. Anatomy and function of extrahypothalamic vasopressin systems in the brain. *Prog Brain Res.* 119, 3-20, 1998.
- DE VRIES, G.J., PANZICA, G.C. Sexual differentiation of central vasopressin and vasotocin systems in vertebrates: different mechanisms, similar endpoints. *Neuroscience.* 138, 947-55, 2006.

DEBIEC, J. From affiliative behaviors to romantic feelings: a role of nanopeptides. *FEBS Lett.* 581, 2580-6, 2007.

DEL CERRO, M.C., PEREZ-LASO, C., ORTEGA, E., MARTIN, J.L., GOMEZ, F., PEREZ-IZQUIERDO, M.A., SEGOVIA, S. Maternal care counteracts behavioral effects of prenatal environmental stress in female rats. *Behav Brain Res.* 208, 593-02, 2010.

DELELLIS, R.A., STERNBERGER, L.A., MANN, R.B., BANKS, P.M., NAKANE, P.K.. Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. Report of a workshop sponsored by the National Cancer Institute. *Am J Clin Pathol.* 71, 483-8, 1979.

DICKERSON, P.A., LALLY, B.E., GUNNEL, E., BIRKLE, D.L., SALM, A.K. Early emergence of increased fearful behavior in prenatally stressed rats. *Physiol Behav.* 86, 586-93, 2005.

ENGELMANN, M., WOTJAK, C.T., EBNER, K., LANDGRAF, R.. Behavioural impact of intraseptally released vasopressin and oxytocin in rats. *Exp Physiol.* 85 Spec No, 125S-30S, 2000.

ESTANISLAU, C., MORATO, S. Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze. *Behav Brain Res.* 163, 70-7, 2005.

FERGUSON, J.N., YOUNG, L.J., INSEL, T.R. The neuroendocrine basis of social recognition. *Front Neuroendocrinol.* 23, 200-24, 2002.

FLEMING, A.S., O'DAY, D.H., KRAEMER, G.W. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neurosci Biobehav Rev.* 23, 673-85, 1999.

FRANCIS, D., DIORIO, J., LIU, D., MEANEY, M.J. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science*. 286, 1155-8, 1999.

GERARDIN, D.C., PEREIRA, O.C., KEMPINAS, W.G., FLORIO, J.C., MOREIRA, E.G., BERNARDI, M.M. Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. *Physiol Behav*. 84, 97-104, 2005.

GIMPL, G., FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*. 81, 629-83, 2001.

GLOVER, V., O'CONNOR, T.G., HERON, J., GOLDING, J. Antenatal maternal anxiety is linked with atypical handedness in the child. *Early Hum Dev*. 79, 107-18, 2004.

GODWIN, J.. Neuroendocrinology of sexual plasticity in teleost fishes. *Front Neuroendocrinol*. 31, 203-16, 2010.

GOODSON, J.L., SCHROCK, S.E., KLATT, J.D., KABELIK, D., KINGSBURY, M.A. Mesotocin and nonapeptide receptors promote estrildid flocking behavior. *Science*. 325, 862-6, 2009.

GOODSON, J.L. THOMPSON, R.R. Nonapeptide mechanisms of social cognition, behavior and species-specific social systems. *Curr Opin Neurobiol*. 20, 784-94, 2010.

Grimm, V.E., Frieder, B., 1987. The effects of mild maternal stress during pregnancy on the behavior of rat pups. *Int J Neurosci*. 35, 65-72.

GUTTELING, B.M., DE WEERTH, C., ZANDBELT, N., MULDER, E.J., VISSER, G.H., BUITELAAR, J.K.,. Does maternal prenatal stress adversely affect the child's learning and memory at age six? *J Abnorm Child Psychol*. 34, 789-98, 2006.

Heinrichs, M., von Dawans, B., Domes, G. Oxytocin, vasopressin, and human social behavior. *Front Neuroendocrinol*. 30, 548-57, 2009.

HOMBERG, J.R., SCHIEPERS, O.J., SCHOFFELMEER, A.N., CUPPEN, E., VANDERSCHUREN, L.J. Acute and constitutive increases in central serotonin levels reduce social play behaviour in peri-adolescent rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 195, 175-82, 2007.

KANWISHER, N., MCDERMOTT, J., CHUN, M.M.,. The fusiform face area: a module in human extrastriate cortex specialized for face perception. *J Neurosci*. 17, 4302-11, 1997.

KINNUNEN, A.K., KOENIG, J.I., BILBE, G. Repeated variable prenatal stress alters pre- and postsynaptic gene expression in the rat frontal pole. *J Neurochem*. 86, 736-48, 2003.

KOENIG, J.I., ELMER, G.I., SHEPARD, P.D., LEE, P.R., MAYO, C., JOY, B., HERCHER, E., BRADY, D.L. Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res*. 156, 251-61, 2005.

KOFMAN, O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 26, 457-70, 2002.

LEE, P.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 Res*. 1156, 152-67, 2007.

LEON, M. Catecholaminergic contributions to early learning. *Adv Pharmacol*. 42, 961-4, 1998.

LEVY, F., MELO, A.I., GALEF, B.G., JR., MADDEN, M., FLEMING, A.S. Complete maternal deprivation affects social, but not spatial, learning in adult rats. *Dev Psychobiol*. 43, 177-91, 2003.

- LIM, M.M., YOUNG, L.J. Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. *Horm Behav.* 50, 506-17, 2006.
- LIBERZON, I., YOUNG, E.A. Effects of stress and glucocorticoids on CNS oxytocin receptor binding. *Psychoneuroendocrinology.* 22, 411-422, 1997.
- LOOKINGLAND, K.J., IRELAND, L.M., GUNNET, J.W., MANZANARES, J., TIAN, Y., MOORE, K.E. 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol concentrations in discrete hypothalamic nuclei reflect the activity of noradrenergic neurons. *Brain Res.* 559, 82-8, 1991.
- LOVIC, V., FLEMING, A.S. Artificially-reared female rats show reduced prepulse inhibition and deficits in the attentional set shifting task--reversal of effects with maternal-like licking stimulation. *Behav Brain Res.* 148, 209-19, 2004.
- MACCARI, S., MORLEY-FLETCHER, S. Effects of prenatal restraint stress on the HYPOTHALAMUS-pituitary-adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations. *Psychoneuroendocrinology.* 32 Suppl 1, S10-5, 2007.
- MAIRESSE, J., LESAGE, J., BRETON, C., BREANT, B., HAHN, T., DARNAUDERY, M., DICKSON, S.L., SECKL, J., BLONDEAU, B., VIEAU, D., MACCARI, S., VILTART, O. Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292, E1526-33, 2007.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 75, 469-86, 2003.
- MAUGHAN, B., MCCARTHY, G. Childhood adversities and psychosocial disorders. *Br Med Bull.* 53, 156-69, 1997.
- MCLEAN, J.H., SHIPLEY, M.T. Postnatal development of the noradrenergic projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *J Comp Neurol.* 304, 467-77, 1991.

MCLEAN, J.H., HARLEY, C.W., DARBY-KING, A., YUAN, Q. pCREB in the neonate rat olfactory bulb is selectively and transiently increased by odor preference-conditioned training. *Learn Mem.* 6, 608-18, 1999.

MOORE, C.L., POWER, K.L. PRENATAL STRESS AFFECTS MOTHER INFANT INTERACTION IN NORWAY RATS. *Developmental Psychobiology.* 19, 235-245, 1986.

MORICEAU, S., SULLIVAN, R.M. Neurobiology of infant attachment. *Dev Psychobiol.* 47, 230-42, 2005

MORICEAU, S., SHIONOYA, K., JAKUBS, K., SULLIVAN, R.M. Early-life stress disrupts attachment learning: the role of amygdala corticosterone, locus ceruleus corticotropin releasing hormone, and olfactory bulb norepinephrine. *J Neurosci.* 29, 15745-55, 2009.

MORLEY-FLETCHER, S., DARNAUDERY, M., KOEHL, M., CASOLINI, P., VAN REETH, O., MACCARI, S. Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test. Effects of a chronic treatment with tianeptine. *Brain Res.* 989, 246-51, 2003.

NAI, Q., DONG, H.W., LINSTER, C., ENNIS, M. Activation of alpha1 and alpha2 noradrenergic receptors exert opposing effects on excitability of main olfactory bulb granule cells. *Neuroscience.* 169, 882-92. 2010.

NAKAMURA, S., KIMURA, F., SAKAGUCHI, T. Postnatal development of electrical activity in the locus ceruleus. *J Neurophysiol.* 58, 510-24, 1987.

NEMSADZE, K., SILAGAVA, M. Neuroendocrine foundation of maternal-child attachment. *Georgian Med News.* 21-6, 2010.

NUMAN, M., STOLZENBERG, D.S. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. *Front Neuroendocrinol.* 30, 46-64, 2009.

O'CRAVEN, K.M., KANWISHER, N. Mental imagery of faces and places activates corresponding stimulus-specific brain regions. *J Cogn Neurosci.* 12, 1013-23. 2000.

PATCHEV, V.K., SCHLOSSER, S.F., HASSAN, A.H.S., ALMEIDA, O.F.X. Oxytocin binding sites in rat limbic and hypothalamic structures: Site-specific modulation by adrenal and gonadal steroids. *Neuroscience.* 57, 537-543, 1993.

PANDIPATI, S., GIRE, D.H., SCHOPPA, N.E. Adrenergic receptor-mediated disinhibition of mitral cells triggers long-term enhancement of synchronized oscillations in the olfactory bulb. *J Neurophysiol.* 104, 665-74, 2010.

PARDON, M., GÉRARDIN, P., JOUBERT, C., PÉREZ-DIAZ, F., COHEN-SALMON, C. Influence of prepartum chronic ultramild stress on maternal pup care behavior in mice. *47*, 858-63, 2000.

PATIN, V., LORDI, B., VINCENT, A., THOUMAS, J.L., VAUDRY, H., CASTON, J. Effects of prenatal stress on maternal behavior in the rat. *Developmental Brain Research.* 139, 1-8, 2002.

PATIN, V., VINCENT, A., LORDI, B., CASTON, J. Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups? *Brain Res Dev Brain Res.* 149, 85-92, 2004.

PATIN, V., LORDI, B., VINCENT, A., CASTON, J. Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 160, 265-74, 2005.

PEDERSEN, C.A. Biological aspects of social bonding and the roots of human violence. *Ann N Y Acad Sci.* 1036, 106-27, 2004.

PEDERSEN, C.A., BOCCIA, M.L. Vasopressin interactions with oxytocin in the control of female sexual behavior. *Neuroscience*. 139, 843-51, 2006.

PEREIRA, M., MORRELL, J.I. Functional mapping of the neural circuitry of rat maternal motivation: effects of site-specific transient neural inactivation. *J Neuroendocrinol*. 23, 1020-35, 2011.

PETERSEN, M.B. The effect of vasopressin and related compounds at V1a and V2 receptors in animal models relevant to human disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 99, 96-103, 2006.

POLTYREV, T., GORODETSKY, E., BEJAR, C., SCHORER-APELBAUM, D., WEINSTOCK, M. Effect of chronic treatment with ladostigil (TV-3326) on anxiogenic and depressive-like behaviour and on activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male and female prenatally stressed rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 181, 118-25, 2005.

POPIK, P., VETULANI, J., VAN REE, J.M. Low doses of oxytocin facilitate social recognition in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 106, 71-4, 1992.

PRYCE, C.R., FELDON, J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 27, 57-71, 2003.

RAINEKI, C., DE SOUZA, M.A., SZAWKA, R.E., LUTZ, M.L., DE VASCONCELLOS, L.F., SANVITTO, G.L., IZQUIERDO, I., BEVILAQUA, L.R., CAMMAROTA, M., LUCION, A.B. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. *Neuroscience*. 159, 31-8, 2009.

Raineki, C., Pickenhagen, A., Roth, T.L., Babstock, D.M., McLean, J.H., Harley, C.W., Lucion, A.B., Sullivan, R.M., 2010. The neurobiology of infant maternal odor learning. *Braz J Med Biol Res.* 43, 914-9.

RICHARDSON, H.N., ZORRILLA, E.P., MANDYAM, C.D., RIVIER, C.L. Exposure to repetitive versus varied stress during prenatal development generates two distinct anxiogenic and neuroendocrine profiles in adulthood. *Endocrinology.* 147, 2506-17, 2006.

ROSE, J.D., MOORE, F.L. Behavioral neuroendocrinology of vasotocin and vasopressin and the sensorimotor processing hypothesis. *Front Neuroendocrinol.* 23, 317-41 2002.

RUSCIO, M.G., SWEENY, T., HAZELTON, J., SUPPATEKUL, P., SUE CARTER, C. Social environment regulates corticotropin releasing factor, corticosterone and vasopressin in juvenile prairie voles. *Horm Behav.* 51, 54-61, 2007.

SABATIER, N. alpha-Melanocyte-stimulating hormone and oxytocin: a peptide signalling cascade in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 18, 703-10, 2006.

SMITH, B.L., WILLS, G., NAYLOR, D. The effects of prenatal stress on rat offsprings' learning ability. *J Psychol.* 107, 45-51, 1981.

SMITH, J.W., SECKL, J.R., EVANS, A.T., COSTALL, B., SMYTHE, J.W. Gestational stress induces post-partum depression-like behaviour and alters maternal care in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 29, 227-44, 2004.

STORM, E.E., TECOTT, L.H. Social circuits: peptidergic regulation of mammalian social behavior. *Neuron.* 47, 483-6, 2005.

SULLIVAN, R.M., WILSON, D.A., LEON, M. Norepinephrine and learning-induced plasticity in infant rat olfactory system. *J Neurosci.* 9, 3998-06, 1989.

SULLIVAN, R.M., MCGAUGH, J.L., LEON, M. Norepinephrine-induced plasticity and one-trial olfactory learning in neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 60, 219-28, 1991a.

SULLIVAN, R.M., TABORSKY-BARBA, S., MENDOZA, R., ITANO, A., LEON, M., COTMAN, C.W., PAYNE, T.F., LOTT, I. Olfactory classical conditioning in neonates. *Pediatrics.* 87, 511-8, 1991b.

SULLIVAN, R.M., WILSON, D.A. The locus coeruleus, norepinephrine, and memory in newborns. *Brain Res Bull.* 35, 467-72, 1994.

SULLIVAN, R.M. Developing a sense of safety: the neurobiology of neonatal attachment. *Ann N Y Acad Sci.* 1008, 122-31, 2003.

SULLIVAN, R.M., WILSON, D.A. Molecular biology of early olfactory memory. *Learn Mem.* 10, 1-4, 2003.

TALGE, N.M., NEAL, C., GLOVER, V. Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *J Child Psychol Psychiatry.* 48, 245-61, 2007.

TOBIN, V.A., HASHIMOTO, H., WACKER, D.W., TAKAYANAGI, Y., LANGNAESE, K., CAQUINEAU, C., NOACK, J., LANDGRAF, R., ONAKA, T., LENG, G., MEDDLE, S.L., ENGELMANN, M., LUDWIG, M. An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition. *Nature.* 464, 413-7, 2010.

TODESCHIN, A.S., WINKELMANN-DUARTE, E.C., JACOB, M.H., ARANDA, B.C., JACOBS, S., FERNANDES, M.C., RIBEIRO, M.F., SANVITTO, G.L., LUCION, A.B. Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Horm Behav.* 56, 93-00, 2009.

TRESCHAN, T.A., PETERS, J. The vasopressin system: physiology and clinical strategies. *Anesthesiology*. 105, 599-612; quiz 639-40, 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 Res*. 589, 15-23, 1992.

UGRUMOV, M.V. Magnocellular vasopressin system in ontogenesis: development and regulation. *Microsc Res Tech*. 56, 164-71, 2002.

URIARTE, N., FERREIRA, A., ROSA, X.F., SEBBEN, V., LUCION, A.B. Overlapping litters in rats: effects on maternal behavior and offspring emotionality. *Physiol Behav*. 93, 1061-70, 2008.

VALLEE, M., MAYO, W., DELLU, F., LE MOAL, M., SIMON, H., MACCARI, S. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci*. 17, 2626-36, 1997.

VARLINSKAYA, E.I., SPEAR, L.P. Social interactions in adolescent and adult Sprague-Dawley rats: impact of social deprivation and test context familiarity. *Behav Brain Res*. 188, 398-405, 2008.

WACKER, D.W., LUDWIG, M. Vasopressin, oxytocin, and social odor recognition. *Horm Behav*, 61, 259-65, 2012.

WARD, H.E., JOHNSON, E.A., SALM, A.K., BIRKLE, D.L. Effects of prenatal stress on defensive withdrawal behavior and corticotropin releasing factor systems in rat brain. *Physiol Behav*. 70, 359-66, 2000.

WEATHINGTON, J.M., ARNOLD, A.R., COOKE, B.M. Juvenile social subjugation induces a sex-specific pattern of anxiety and depression-like behaviors in adult rats. *Horm Behav*. 61, 91-9, 2012.

- WELLER, A., GLAUBMAN, H., YEHUDA, S., CASPY, T., BEN-URIA, Y. Acute and repeated gestational stress affect offspring learning and activity in rats. *Physiol Behav.* 43, 139-43, 1988.
- WINKELMANN-DUARTE, E.C., TODESCHIN, A.S., FERNANDES, M.C., BITTENCOURT, L.C., PEREIRA, G.A., SAMIOS, V.N., SCHUH, A.F., ACHAVAL, M.E., XAVIER, L.L., SANVITTO, G.L., MANDARIM-DE-LACERDA, C.A., LUCION, A.B. Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. *Brain Res.* 1170, 20-30, 2007.
- WINSLOW, J.T., HASTINGS, N., CARTER, C.S., HARBAUGH, C.R., INSEL, T.R. A role for central vasopressin in pair bonding in monogamous prairie voles. *Nature.* 365, 545-8, 1993.
- YAKA, R., SALOMON, S., MATZNER, H., WEINSTOCK, M. Effect of varied gestational stress on acquisition of spatial memory, hippocampal LTP and synaptic proteins in juvenile male rats. *Behav Brain Res.* 179, 126-32, 2007.
- YANG, J., LI, W., LIU, X., LI, Z., LI, H., YANG, G., XU, L., LI, L. Enriched environment treatment counteracts enhanced addictive and depressive-like behavior induced by prenatal chronic stress. *Brain Res.* 1125, 132-7, 2006.
- YOUNG, K.A., GOBROGGE, K.L., LIU, Y., WANG, Z. The neurobiology of pair bonding: insights from a socially monogamous rodent. *Front Neuroendocrinol.* 32, 53-69, 2011.
- YUAN, Q., HARLEY, C.W., DARBY-KING, A., NEVE, R.L., MCLEAN, J.H. Early odor preference learning in the rat: bidirectional effects of cAMP response element-binding protein (CREB) and mutant CREB support a causal role for phosphorylated CREB. *J Neurosci.* 23, 4760-5, 2003.

