

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-NEUROCIÊNCIAS

**Efeitos da Manipulação Neonatal sobre Comportamentos Sociais  
e a expressão de receptores de Ocitocina em ratos neonatos e juvenis**

Tese de Doutorado

Ana Raquel Menezes Karkow

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-NEUROCIÊNCIAS

Estudo dos Efeitos da Manipulação Neonatal sobre Comportamentos Sociais  
e a expressão de ocitocina em ratos neonatos e juvenis

Ana Raquel Menezes Karkow

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor em  
Neurociências

## ***Agradecimentos***

*A esta Universidade que me acolheu e permitiu meu crescimento oferecendo ensino como oportunidade e suporte durante a minha trajetória.*

*Ao meu orientador Aldo Lucion que desde a Iniciação Científica me incentivou e amparou com o exemplo de professor e orientador que é.*

*Aos Professores que fizeram parte desta conquista que me ampararam com paciência e entusiasmo.*

*Aos amigos: Juliana Bonini, Weber Cláudio Nunes da Silva, Ximena Rosa, Liana Bohn, Daniel Rosa, Ana Moreno, Cláudia Ponticelli, Carlos Kuhn, Thiago Henriques, Luiza Diehl, Marcelo Alvez de Souza, Vivi Velho e Suliana Rangel por me mostrarem a leveza da vida e a solidez da amizade. Ao meu amor Daniel Pereira Dorneles pela paciência e bons conselhos.*

*Aos meus tios: Elizabete Karkow, Francisco Karkow, Luís Paulo Karkow, Marisa Karkow pela ajuda e solidariedade.*

*Ao Jorge La Rosa pelo aconselhamento e por ser um exemplo de ser humano pra mim. A psicoterapeuta Andréia Ponsi que me amparou de maneira eficiente e humana nos momentos difíceis.*

*Em especial à minha irmã Maria José Karkow, trabalhadora e amiga de todas as horas. Ao meu irmão Alberto Jean Karkow que é a luz da minha vida que me motiva a ser sempre uma pessoa melhor e a nunca desistir dos meus sonhos.*

*Por fim, agradeço a minha mãe Maria Salete Menezes Karkow (in memoriam) que trabalhou tanto para que eu pudesse estudar e que me ensinou a amar e ter bons valores.*

*“Dedico esta tese à minha querida e amada mãe Maria Salete (in memoriam).”*

## LISTA DE ABREVIATURAS

5 HT - 5 hidróxitriptamina, serotonina  
ACTH - hormônio adrenocorticotrófico  
ANOVA - análise de variância  
CRH - hormônio liberador de corticotrofinas  
EPM - erro padrão da média  
GH - hormônio do crescimento  
i.p. - intraperitoneal  
LC - *locus coeruleus*  
LH - hormônio luteinizante  
ME - eminência mediana  
NA - noradrenalina  
OT – ocitocina  
OTR- receptores para ocitocina  
OTA - antagonista para o receptor de ocitocina  
PVN - núcleo paraventricular do hipotálamo  
PND: dias pós-nascimento  
SNC - sistema nervoso central  
SON - núcleo supraóptico do hipotálamo  
VP - vasopressina

## **LISTA DE FIGURAS**

### **CAPÍTULO I**

*Figure 1. Esquema metodológico do teste de agregação social.*

*Figure 2. Arena de campo aberto para avaliar locomoção (ratos de 11 dias de idade)*

*Figure 3. Resultados Tempo de permanência em separado aos 11 dias de idade.*

*Figure 4. Resultados Tempo de permanência em separado aos 7 dias de idade.*

*Figure 5. Resultados Tempo de locomoção aos 11 dias de idade*

### **CAPÍTULO II**

*Figure 1. Procedimento da Manipulação Neonatal.*

*Figure 2. Colônias agrupadas em caixas de acrílico.*

*Figure 3. Ratos Wistar juvenis.*

*Figure 4. Resultados do comportamento de Atacar (Pouncing) em três idades (25, 30 e 35 dias).*

*Tabela 1: Resultados dos comportamentos de Perseguir, Rolar e Pular em três idades (25, 30 e 35 dias).*

### **CAPÍTULO III**

*Figure 1. Resultado: Nível de expressão de receptores de ocitocina no 11º dia de idade no córtex frontal.*

*Figure 2. Resultado: Nível de expressão de receptores de ocitocina no 30º dia de idade no córtex frontal.*

*Figure 3. Resultado: Nível de expressão de receptores de ocitocina no 11º dia de idade no locus coeruleus.*

*Figure 4 Resultados: Nível de expressão de receptores de ocitocina no 30º dia de idade no locus coeruleus*

*Figure 5 Resultados: Nível de expressão de receptores de ocitocina no 11º dia de idade no bulbo olfatório*

*Figure 6. Resultado: Nível de expressão de receptores de ocitocina no 30º dia de idade no bulbo olfatório.*

## **RESUMO**

### **Efeitos da Manipulação Neonatal sobre Comportamentos Sociais e a expressão de ocitocina em ratos neonatos e juvenis**

O período inicial da vida dos animais é de fundamental importância para a formação das ligações sociais e o estabelecimento da relação do indivíduo com o ambiente. O contexto do neonato é o aspecto mais importante de estimulação para os ratos recém-nascidos sendo de fundamental importância para a organização de respostas comportamentais durante as etapas precoces do desenvolvimento. O objetivo da presente tese foi estudar os efeitos da manipulação neonatal sobre o desenvolvimento comportamental social no período pós-natal (7º e 11º dia de idade) e juvenil (25º, 30º e 35º dia de idade) e quantidade de receptores de ocitocina no córtex pré-frontal, locus coeruleus e bulbo olfatório (7º e 11º dia de idade). Os resultados demonstraram que a manipulação neonatal induz déficits em comportamentos sociais iniciais revelando ter um efeito determinante sobre o desenvolvimento do comportamento social precoces em ratos. Verificamos uma diminuição no comportamento de agregação social nas duas idades estudadas (7º e 11º dias de idade) e uma diminuição do comportamento de brincadeira nas três idades estudadas (25º 30º e 35º dias de idade). Além disto, verificamos que a manipulação neonatal diminui a expressão de receptores de ocitocina no bulbo olfatório no 30º dia de idade demonstrando que o efeito da manipulação neonatal é prevalente por toda vida do animal. Estes resultados evidenciam a importância da experiência precoce como moduladora das respostas comportamentais sociais ainda no período neonatal e na puberdade. Conclui-se assim, que, a manipulação no período neonatal interfere negativamente no estabelecimento de relações sociais, podendo ter como causa uma possível alteração no sistema ocitocinérgico.

## **ABSTRACT**

Effects of Neonatal Handling on Social Behaviors and expression of oxytocin in rats neonates and juveniles

The initial period of life in animals is of fundamental importance for the formation of social bonds and the establishment of relationships between the individual and the environment. The newborn's context is the most important aspect of stimulation for newborn rats being essential for the organization of behavioral responses during the early stages of development. The aim of this thesis was to study the effects of neonatal handling on the behavioral development during the postnatal (7 and 11 days old) and juvenile periods (25 °, 30 ° and 35 days of age), well as the amount of oxytocin receptors in prefrontal cortex, olfactory bulb and locus coeruleus (7 and 11 days of age). The results demonstrated that neonatal handling induces deficits in social behaviors revealing a decisive impact on the development of early social behavior in rats. We observed a decrease social aggregation behavior in both age groups (7 and 11 days of age) and a decrease in play behavior at the three age groups (25, 30 and 35 days old). Furthermore, we demonstrated that neonatal handling decreased the expression of oxytocin receptors in the olfactory bulb at 30 days of age showing that the effects of neonatal manipulation are prevalent throughout the animal's life. These results highlight the importance of early experience as a modulator of social behavioral responses even during the neonatal period and puberty. We conclude therefore that the manipulation during the neonatal period impairs the establishment of social relations, can be caused by a possible change in the oxytocin system.



## Sumário

INTRODUÇÃO GERAL .....	11
Manipulação Neonatal.....	11
Comportamentos Sociais.....	16
Interação social.....	16
Comportamento de Agregação Social.....	18
Comportamento de Brincadeira .....	20
Ocitocina .....	23
Sistema Ocitocinérgico .....	26
JUSTIFICATIVA GERAL .....	29
HIPÓTESES.....	30
OBJETIVO GERAL .....	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS.....	32
Manipulação Neonatal.....	32
Animais .....	32
ESTIMULAÇÃO NEONATAL .....	33
Procedimento de Manipulação Neonatal.....	335
OBJETIVOS .....	36
MATERIAL E MÉTODOS .....	37
TESTE PARA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE AGREGAÇÃO SOCIAL.....	37
TESTE DE CAMPO ABERTO EM FILHOTES DE 11 DIAS .....	38
ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	39
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	39
RESULTADOS.....	40
TEMPO SEPARADO NO 7º PND .....	40
TEMPO DE LOCOMOÇÃO NO 11º PND .....	42
DISCUSSÃO.....	43
CAPÍTULO 2.....	47
OBJETIVOS .....	48
REGISTRO E ANÁLISE DOS COMPORTAMENTOS DE BRINCADEIRAS .....	49
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	51
RESULTADOS.....	52
Comportamentos de Brincadeira.....	52

Tabela 1. Resultados descritivos de “Perseguir” e “Rolar” no 25º, 30º e 35º PND. ....	54
DISCUSSÃO.....	57
CAPÍTULO 3 .....	61
OBJETIVO.....	62
MATERIAIS E MÉTODOS .....	63
Obtenção do Material Biológico .....	63
Córtex Pré-Frontal e Bulbo Olfatório.....	63
Obtenção do <i>Locus Coeruleus</i> pela Técnica de “Punch” .....	63
Análise da expressão protéica ( <i>Western Blot</i> ).....	64
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	65
RESULTADOS .....	66
Quantificação dos Receptores de Ocitocina no Córtex Pré-Frontal, Locus Coeruleus e Bulbo Olfatório. ....	66
Córtex Pré-Frontal no 11º e 30 ºdia de idade .....	66
Locus Coeruleus no 11º e 30 ºdia de idade .....	66
Bulbo Olfatório no 11º e 30 ºdia de idade .....	67
Discussão.....	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	75
DISCUSSÃO GERAL .....	76
CONCLUSÕES.....	81
ANEXO I .....	82
ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO .....	82
REFERÊNCIAS .....	84

# INTRODUÇÃO GERAL

## Manipulação Neonatal

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) é influenciado pelos eventos adjacentes ao período inicial de vida em mamíferos. Nesta etapa existe uma susceptibilidade vinculada à plasticidade das estruturas cerebrais. O SNC ainda está em formação durante os primeiros dias após o nascimento em roedores e humanos (Zimmerberg & Sageser 2011; Huppertz-Kessler et al. 2012).

Devido às dificuldades inerentes à realização de pesquisas envolvendo humanos, os efeitos de intervenções no período pós-natal têm sido mais estudados em modelos animais. Os filhotes de rato são altriciais, durante os primeiros dias de vida estão desprovidos de pêlo, carecem de mecanismos de controle da temperatura corporal, não se locomovem por si mesmos e são incapazes de ver ou ouvir, dependendo totalmente dos cuidados maternos para sua sobrevivência. A principal fonte de estimulação sensorial (tátil, térmica, olfativa) durante as primeiras semanas de vida é fundamentalmente, provida no ninho, pela mãe e os irmãos.

As interações normais na relação mãe-filhote são cruciais para o desenvolvimento e crescimento adequados dos filhotes. A mãe é responsável pela regulação de várias respostas fisiológicas dos filhotes, como por exemplo, a frequência cardíaca, os ciclos de sono-vigília e a produção do hormônio de crescimento (GH) (Levine 2001). A privação materna ocasiona efeitos deletérios no desenvolvimento dos filhotes, como a redução do crescimento, da diferenciação celular e da secreção do GH,

provocando também um aumento da secreção de corticosterona (CORT) (Anderson & Schanberg 1972; Pauk et al. 1986).

Um dos modelos experimentais que possibilita testar hipóteses sobre este período crítico do desenvolvimento é a manipulação neonatal em ratos. Em ratos, a manipulação consiste em afastar os filhotes do ninho por 3-15 minutos, podendo incluir ou não a estimulação tátil do filhote feita pelo experimentador. Este procedimento quando realizado nas duas primeiras semanas de vida repercute em diversos efeitos comportamentais. Plotsky & Meaney (1993) relataram que ratos manipulados por 15 minutos durante as primeiras três semanas de vida possuem menor reatividade ao estresse quando adultos e menos "medo" a ambientes novos. A manipulação aparentemente é considerada uma intervenção branda.

O contato maternal é apontado por diversos autores como um dos aspectos principais para o desenvolvimento de alterações em ratos submetidos à manipulação neonatal (Cirulli et al. 2003). Em ratos, o ambiente logo após o nascimento é composto da mãe e dos irmãos. A mãe constrói um ninho onde mantém os filhotes aquecidos e durante os primeiros dias pós-parto ela raramente afasta-se deste ninho (Numan 1988). O fato de retirar os filhotes da ninhada gera na mãe um aumento nos cuidados quando do retorno deles para a caixa-moradia logo após a manipulação neonatal (Branchi et al. 2001; Pryce et al. 2001). O comportamento da mãe durante o período pós-parto é alterado em função dos cuidados da prole. Em maior grau, ocorrem comportamentos como a hipervigilância, e obsessividade que pode melhorar e garantir a saúde e sobrevivência do recém-nascido.

Tal procedimento de manipulação provoca nos filhotes alteração persistente no funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), além de alterações comportamentais, metabólicas e neuroquímicas. Na idade adulta esses animais

apresentam menor medo quando expostos a ambiente diferente da caixa-moradia, com maior atividade e exploração (Levine 1967).

Também apresentam uma persistência da exacerbação da retroalimentação negativa dos glicocorticóides na vida adulta (Ader 1969), com redução da expressão de RNA mensageiro para hormônio liberador de corticotropina (CRH) no hipotálamo e diminuição do conteúdo de CRH na eminência média (Plotsky & Meaney 1993). Além disso, há maior concentração de receptores glicocorticóides no hipocampo (Meaney et al. 1989), com aumento da inibição mediada pelo hipocampo e diminuição da excitação mediada pela amígdala na resposta neuroendócrina do eixo HPA (De Kloet et al. 1998).

Os animais submetidos ao modelo da manipulação neonatal liberam de forma diminuída noradrenalina no núcleo paraventricular do hipotálamo em resposta a estresse por contenção (Liu et al. 2000) o que contribui para uma supressão crônica da resposta de liberação de glicocorticóides frente ao estresse pelo eixo.

O fato de retirar os filhotes da ninhada gera na mãe um aumento nos cuidados quando do retorno deles para a caixa-moradia logo após a manipulação neonatal (Branchi et al. 2001; Pryce et al. 2001).

Além de alterações na resposta ao estresse agudo, animais manipulados no período neonatal também apresentam respostas atenuadas ao estresse crônico repetido (Papaioannou et al. 2002), com menor indução de desamparo aprendido após choque inescapável (Costela et al. 1995), possivelmente por alterações específicas na neurotransmissão noradrenérgica. Há descrição de menor inibição comportamental com maior exposição ao predador em um campo aberto, aumento no comportamento materno agressivo (Padoin et al. 2001), menor indução de medo condicionado relacionado ao contexto (Madruga et al. 2006) e melhor memória espacial (Meaney et al. 1988; Tang 2001; Bilbo et al. 2007).

O modelo de manipulação neonatal está associado a uma menor vulnerabilidade à depressão na vida adulta (Papaioannou et al. 2002; Arborelius & Eklund 2007) e à reversão de efeitos adversos do estresse pré-natal (Lemaire et al. 2006) e da hipóxia-isquemia (Rodrigues et al. 2004) no dano neuronal hipocampal, sem alterar o desfecho comportamental nem a atrofia dendrítica causada por lesões maiores como a remoção do córtex medial frontal (Gibb & Kolb 2005).

Fêmeas manipuladas no período neonatal demonstram menor receptividade sexual, menores níveis de prolactina no proestro (Gomes et al. 2005) e maior número de ciclos anovulatórios na vida adulta (Gomes et al. 1999). O comportamento sexual é diminuído também em machos (Padoin et al. 2001). Além disso, apresentam menor secreção de estrogênio, LH e FSH no proestro (Gomes et al. 2005).

Vários estudos descrevem a associação entre a manipulação neonatal e alterações persistentes de diversos sistemas neurotransmissores em diferentes áreas cerebrais. Por exemplo, há descrição de aumento do número de receptores 5HT1-A no hipocampo de ratos adultos machos manipulados no período neonatal (Stamatakis et al. 2006) assim como maiores níveis de serotonina no hipotálamo desses animais após o estresse agudo (Papaioannou et al. 2002). Há maior metabolismo dopaminérgico no hipotálamo de machos adultos manipulados na vida precoce (Papaioannou et al. 2002), sem alteração no número de neurônios expressando tirosina-hidroxilase nessa estrutura (Hermel et al. 2001).

Outro estudo mostra menor quantidade de receptores D3 no núcleo acumbens desses animais. Alterações em sistemas como o GABA/BDZ (Caldji et al. 2000) e noradrenérgico (Liu et al. 2000) também já foram descritas em estruturas cerebrais específicas.

A estimulação neonatal também modifica padrão de comportamento alimentar em ratos adultos. Esses animais apresentam um apetite aumentado por alimento doce que não é modificado após a administração de diazepam, sugerindo que essa alteração comportamental não é devida à ansiedade aumentada (Silveira et al. 2005).

Para compreender as alterações promovidas pela manipulação neonatal temos que discutir o conceito de reconhecimento do odor maternal. A aprendizagem olfatória é fundamental para sobrevivência de filhotes altriciais como ratos, pois eles dependem da mãe para proteção, manutenção da temperatura corporal e alimentação. Essa identificação da mãe ocorre devido ao aprendizado olfatório, que se dá pelo pareamento do cuidado maternal (estímulo tátil) com o cheiro da mãe. Em estudo sobre aprendizado olfatório, verificou-se que a manipulação repetida no sétimo dia de idade induz em fêmeas uma diminuição no aprendizado olfatório (Rainecki et al. 2009).

Há estudos demonstrando que a manipulação neonatal em ratos pode influenciar o número de neurônios encontrados em diferentes áreas do sistema nervoso central. A manipulação neonatal induz uma redução permanente em torno de 35% do número das células nervosas do *locus coeruleus* em ratos de 11, 26, 35 e 90 dias de idade, tanto em machos quanto em fêmeas (Lucion et al. 2003). A manipulação promove na amígdala medial, uma diminuição no número de neurônios aos 11 e 90 dias de idade, como também nos neurônios das camadas 2 e 3 do córtex frontal no 11º dias de vida em ratos machos e fêmeas (Lucion et al. 1999). Além disso, também foi constatada uma redução no número de neurônios na região parvocelular do núcleo paraventricular e supra-óptico do hipotálamo, e um aumento na densidade de neurônios na área CA1 do hipocampo (lado esquerdo) (Winkelmann-Duarte et al. 2007; Winkelmann-Duarte et al. 2011).

Foram observadas alterações importantes em neurotransmissores, que também sofrem influência de variações no ambiente neonatal. Ratos manipulados apresentaram

alterações nos níveis de dopamina e serotonina (5HT). Em diferentes áreas do SNC, houve aumento dos níveis de 5HT no hipocampo e aumento do metabolismo da dopamina no hipotálamo. Estas alterações foram observadas em ratos pré-púberes e na idade adulta, tanto nos níveis basais como induzidos por estresse (Papaioannou et al. 2002).

## **Comportamentos Sociais**

### **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, o estabelecimento de vínculos sociais, e o desenvolvimento de psicopatologias na idade adulta (Jaffee & Price 2012).

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. Na maioria dos mamíferos, a ocorrência dos comportamentos sociais aparece com mais frequência durante o período da adolescência. 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.

O comportamento de agregação entre irmão (em ratos) pode ser considerado um precursor dos comportamentos sociais como, por exemplo, o comportamento de brincadeira. O comportamento de brincadeira se relaciona intrinsecamente com a agregação social, pois é um reflexo das aprendizagens que se iniciaram na idade pós-natal: quando a agregação social é exibida (Schank & Alberts 2000). O repertório comportamental social de ratos neonatos amplia-se e tem sua origem nos comportamentos de agregação social e de brincadeira que se estabelecem a partir do reconhecimento social.

O reconhecimento social envolve a detecção, incorporação, integração, reconhecimento e processamento de informações sobre indivíduos da mesma espécie, e permite que o animal possa reagir adequadamente a estímulos sociais através de uma variedade de contextos. Para que o reconhecimento social ocorra, o animal deve simplesmente reconhecer outro animal como familiar. Isto envolve uma detecção inicial do sujeito, seja pela visão, olfato, tato, audição, e a lembrança eventual do encontro posterior. Após este reconhecimento, uma resposta de investigação olfativa apropriada pode ser aumentada ou diminuída; assim como a agressão, ou filiação. O início de uma resposta de luta ou fuga ocorre dependendo da experiência anterior do animal teste. Desse modo, ratos podem diferenciar membros da colônia de intrusos estranhos.

Agressão dentro de uma colônia de ratos é normalmente baixa, enquanto a agressão de membros da colônia a intrusos machos pode ser muito elevada (Blanchard & Blanchard 1988). A interação contínua não é necessária para esta diferença, com a

remoção e substituição subsequente de um membro da colônia não eliciar agressão (Alberts & Galef 1973). Isto sugere fortemente um papel para o reconhecimento social em essas interações dependentes do contexto.

### **Comportamento de Agregação Social**

Os comportamentos sociais na vida adulta são afetados por alterações que ocorrem durante a formação do sistema nervoso central, como por exemplo, durante o período pré-natal ou pós-natal. Nos primeiros dias de idade o contexto social do filhote se resume a relação com a mãe e a ninhada que é composta por seus irmãos.

A agregação social entre irmãos é um comportamento que ocorre naturalmente entre membros de uma mesma ninhada mantidos juntos nos primeiros dias de vida (Eilam & Golani 1988). Os filhotes se aproximam uns dos outros ficando agrupados, possivelmente para manter a temperatura corporal. Este comportamento normalmente envolve a mãe que os amamenta (Schank & Alberts 2000). Estes filhotes de ratos Wistar até o décimo segundo dia de vida ainda apresentam os olhos fechados e se orientam pela olfação. Assim, quando colocadas em uma superfície plana de uma arena em uma câmara de temperatura controlada, os filhotes exibem atividade sustentada de locomoção e agregação dinâmica (Schank & Alberts 2000; Alberts 2007).

Se aglutinados, se comportam como um “superorganismo”, mostrando-se capacidades para a termorregulação e conservação de energia muito além do indivíduo (Alberts 1978; Alberts 1978; Alberts & Brunjes 1978). A agregação dos neonatos pode ser explicada por modelos computacionais que representam as preferências do filhote para filhotes (Schank & Alberts 2000). Apesar de ainda serem incapazes de

termorregulação como adultos e, assim, adquirir rapidamente a temperatura ambiente (Alberts 1978).

Durante a fase imatura (em torno do sétimo dia de idade) o trato corticoespinhal começa a se desenvolver. O décimo dia de idade é o fim da fase imatura onde a locomoção juntamente com atividade em grupo, pode ser melhor analisada (Schank & Alberts 2000). Filhotes de sete e onze dias de idade ainda não apresentam a locomoção típica de adultos. Apresentam as patas ligeiramente separadas e a barriga encostada no chão dificultando sua locomoção. O surgimento da atividade vinculada ao contexto de grupo é um indicador do surgimento de comportamento social do décimo dia de idade (Schank & Alberts 2000).

A agregação social é um parâmetro para avaliação de interação social em idade precoce (Schank & Alberts 2000). Assim, a análise de comportamento em campo aberto pode revelar uma série de indicadores comportamentais relacionáveis ao comportamento adulto. O desenvolvimento de redes neurais e conexões cerebrais descendentes marca o encerramento da fase imatura da locomoção quando a atividade acoplada em grupos pode ser detectada pela agregação social.

No décimo dia de idade, a ocitocina (administrada I.P.) em ratos facilita a agregação social em relação ao controle salina (Kojima & Alberts 2011). Em contraste, os receptores de ocitocina quando bloqueados pelo antagonista torna a agregação mais difusa. Estes resultados não foram explicados pelo efeito térmico da ocitocina. Os mesmos procedimentos experimentais não alteraram a agregação social no sétimo dia de idade. Assim, evidenciou-se que a ocitocina afeta o comportamento dos filhotes a partir de uma idade específica.

O comportamento de agregação social parece ser importante, pois fornece informações sobre a capacidade deste animal de perceber um indivíduo semelhante e

assim se manter aquecido e nutrido; o que é fundamental para a sobrevivência do mesmo. Outro aspecto importante envolvido neste comportamento seria a capacidade de locomoção. Visto que os ratos que foram manipulados no período neonatal apresentam diversas características comportamentais anômalas na vida adulta seria importante investigar se o comportamento de agregação social entre irmãos apresenta alguma alteração devido ao procedimento da manipulação neonatal.

### **Comportamento de Brincadeira**

O período neonatal e o período juvenil são etapas críticas para a formação das ligações sociais, assim como também, para o estabelecimento da relação do indivíduo com o ambiente (Spear 2000). Os comportamentos sociais podem ser considerados positivos onde ocorrem benefícios mútuos além dos comportamentos considerados agressivos. As ligações sociais podem se formar entre pais e filhotes, entre dois adultos ou entre outros membros do grupo e proporcionam vantagens, entre elas a de garantir a sobrevivência da espécie e a de defesa contra a predação.

O comportamento de brincadeira inicia-se na fase pós-desmame em ratos e diversos autores afirmam que se trata de uma atividade fundamental para o desenvolvimento social e cognitivo (Homborg et al. 2007). Comportamento de brincadeira é a atividade motora que o indivíduo apresenta após o nascimento e que parece não ter um objetivo imediato, no qual padrões motores de outros contextos podem ser usados de forma modificada e alterada em termos de seqüência temporal e com alternância de dominância (Bekoff & Byers 1998).

Os padrões motores, de maneira geral, se repetem com freqüência e são usados exageradamente (Fagen 1981). Os benefícios da brincadeira podem ser resumidos em:

treinamento físico; desenvolvimento de habilidades sociais; competição intraespecífica; promoção de vínculos e coesão social (Fagen1981). Os componentes envolvidos em brincadeiras de luta se assemelham aos comportamentos sociais, agressivo e sexual exibidos na idade adulta (Pellis et al. 1992). Brincadeiras envolvendo animais machos adultos e juvenis parecem refletir a formação precoce de dominância social hierarquias em ratos (Meaney et al. 1985).

Conforme revisão (Meaney & Stewart 1981) existem dúvidas sobre a utilização do isolamento social como meio para comprovar a importância do comportamento de brincadeira no desenvolvimento do animal. O animal privado de interações sociais não fica apenas privado de brincadeira, mas outros comportamentos também são alterados quando ele está sozinho. Contudo, foram realizados experimentos em que foi possível relacionar a falta de brincadeira com alterações de comportamento na vida adulta.

Os comportamentos sociais são influenciados fortemente por alterações que ocorrem durante a formação do sistema nervoso central durante o período pré-natal ou pós-natal. Os efeitos deletérios do isolamento social em ratos albinos criados sozinhos entre 25 e 45 dias de idade foram minimizados se os animais pudessem brincar com um parceiro durante uma hora por dia (Einon et al. 1978).

Há diversos modelos que reproduzem perturbações na relação mãe-filhote que repercutem na vida adulta: estresses por separação longa, por manipulações breves, por alteração das condições do ninho. Estas alterações na relação mãe-filhote apresentam um impacto repercutindo nos comportamentos e alterações em sistemas neurais na vida adulta (Fenoglio et al. 2006). Eventos que estressam a rata parturiente (estresse pré-natal) levaram a mudança nas interações sociais dos animais na vida adulta, os machos apresentaram redução no comportamento de cheirar e um aumento na agressividade (Patin et al. 2005).

Aguilar e colaboradores (2009) discute a hipótese de que estes estudos anteriores sobre manipulação neonatal e comportamento de brincadeira não consideraram a possibilidade de uma profunda mudança induzida pela manipulação neonatal nos sistemas motivacionais subjacentes à vontade de brincar como os sistemas de medo ou de recompensa. O autor discute que caso a motivação para o comportamento de brincar fosse reforçada pela manipulação neonatal de modo específico, isto poderia indicar que existe um sistema motivacional que induz um auto reforçamento de comportamentos positivos, sensíveis em períodos críticos.

Aguilar e colaboradores (2009) buscaram estabelecer relação entre a manipulação neonatal e a motivação de brincar em ratos juvenis. Na tentativa de distanciar explicações alternativas baseadas no medo (ou novidade) os autores desenvolveram um delineamento onde verificaram que há um aumento na motivação para brincar de ratos manipulados quando comparados com ratos não manipulados.

Para explicar o aumento do comportamento de brincar em ratos manipulados os autores propõem duas interpretações em termos de “medo baixo”. O primeiro atribuiu o aumento da brincadeira em ratos manipulados a uma maior habituação ao contato humano, de modo que os ratos não manipulados apresentavam maior medo durante os testes por causa do contato com experimentador "desconhecido"; e o segundo atribuiu o aumento da brincadeira para reduzir a susceptibilidade ao medo em situações de ameaça em relação aos controles não tratados.

Os estudos de Siviý & Harrison (2008) e Aguilar e colaboradores (2009) relatam as repercussões da manipulação neonatal sobre comportamentos sociais utilizando diferentes metodologias. Tais metodologias não permitem avaliar a linha de base de ocorrência dos comportamentos já que são registrados em testes e arenas. Portanto, seria

importante avaliar os comportamentos sociais de maneira espontânea para compreender como poderia ocorrer no ambiente natural.

Neste trabalho foi avaliado a ocorrência do comportamento de brincadeira em situações que permitem nos aproximar da linha de base de ocorrência espontânea.

A manipulação neonatal induz diversas alterações comportamentais na vida adulta que podem estar relacionadas com o estabelecimento de interações sociais durante o início da vida do animal. O estudo do comportamento de brincadeira dos animais manipulados pode nos fornecer informações importantes sobre estas primeiras interações sociais e suas repercussões na formação de padrões de comportamentos sociais na vida adulta.

## **Ocitocina**

A Ocitocina (OT) é liberada no Sistema Nervoso Central (SNC) por meio de neurônios parvocelulares, os quais estão localizados no Núcleo Paraventricular e em outras regiões do cérebro (Kendrick 2004). Sendo assim, a OT possui ações periférica e central, sendo que sua ação periférica na amamentação e no período gestacional está bem estabelecida.

A ocitocina funciona como um neuromodulador complexo que medeia comportamentos sociais e reprodutivos, incluindo o acasalamento, a formação de ligação do par, e comportamento materno (Kendrick 2004). A ocitocina tem efeitos sobre o humor, memória, integração sensorial olfativa e apetite. Estes efeitos são mediados através de projeções de neurônios ocitocinérgicos que são amplamente distribuídos por todo o cérebro (Pedersen & Boccia 1992). A OT também pode ser

considerada um hormônio típico do estresse a qual pode estar envolvida no controle neuroendócrino das respostas ao estresse, podendo também estar envolvida em psicopatologias relacionadas ao estresse, tais como a depressão (Consiglio 2006).

Quando liberada centralmente age como um neuromodulador com diversas funções no comportamento maternal (Pedersen et al. 1995) comportamento sexual, promoção de relações sociais positivas (Ferguson et al. 2002), resposta ao estresse (Neumann et al. 2000a; Neumann et al. 2000b) e ação ansiolítica em ratas (Bale et al. 2001).

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

A OT também pode ser liberada durante a escolha e a formação de pares e seus receptores centrais, em áreas subcorticais importantes, são ativados durante alguns tipos específicos de sentimentos, como o amor maternal (para revisão, Zeki 2007). Este peptídeo pode agir regulando comportamentos relacionados a estresse e no aprendizado e memória, bem como na emocionalidade, em associação com a vasopressina (VP) (Engelmann et al. 2000). A OT facilita a motivação social e o comportamento de aproximação, e parece ser fundamental para o estabelecimento de vínculos sociais (Young & Frank 1999).



Camundongos nocautes de OT também têm sido usados no entendimento das funções desempenhadas centralmente por esse neuropeptídeo. Camundongos fêmeas nocautes de OT (OT -/-) apresentaram níveis maiores de ansiedade quando comparados com o grupo controle (OT +/+) e que este quadro se revertia quando era administrada OT centralmente (Mantella et al. 2003).

Também foi demonstrado em camundongos OT +/+ que quando administrado o antagonista do receptor de OT induz um aumento da ansiedade. Os autores atribuíram o aumento da ansiedade em camundongos OT -/- à ausência de vias ocitocinérgicas, as quais podem estar relacionadas com a modulação da ansiedade. Além disto, estudos em ratas e camundongos fêmeas demonstraram queda da ansiedade após administração central de OT (McCarthy et al. 1996; Amico et al. 2004).

Entretanto, ainda não é possível concluir que a OT endógena desempenha necessariamente essas funções (Amico et al. 2004). Estudos em humanos ainda são escassos e relativamente limitados devido à dificuldade de administração da OT, uma vez que em roedores é realizada central ou intravenosamente. Uma alternativa prática e viável é a administração intranasal de neuropeptídeos, os quais através desta técnica são encontrados no líquido cefalorraquidiano de humanos e ainda em uma variedade de regiões cerebrais em ratos (Heinrichs et al. 2003). Dados iniciais utilizando a administração intranasal de OT em humanos sugerem que pode reduzir respostas hormonais e subjetivas ao estresse psicossocial.

A maior parte dos estudos sugere que a administração de OT diminui a secreção de glicocorticoides (Neumann et al. 2000a; Neumann et al. 2000b; Heinrichs & Baumgartner 2003) e como descrito acima, atenua a ansiedade (Bale et al. 2001) Ratas que foram submetidas à administração intracerebroventricular de OT secretaram menos corticosterona quando submetidas a um estresse psicológico (barulho) e ainda se

mostraram menos ansiosas em um modelo de ansiedade. Windle et al. (1997) ainda demonstraram uma relação dose-dependente entre a concentração administrada de OT e a liberação de corticosterona em resposta ao estresse (barulho).

Estudos em camundongos fêmeas nocautes em OT também ajudam a esclarecer a função da OT na modulação do eixo HPA. Pesquisadores demonstraram um aumento significativo da liberação de corticosterona induzida pelo estresse (Amico et al. 2004) e da ansiedade nestes animais (Mantella et al. 2003). Além de níveis maiores de corticosterona, estes camundongos apresentam menor expressão de cFOS na amígdala medial quando submetidos a estresse psicológico, área esta, envolvida com a ativação do eixo HPA e conseqüente liberação de corticosterona.

Além disso, pesquisas recentes sugerem que a OT está relacionada com a redução dos níveis de ACTH em macacos (Parker et al. 2005) e de cortisol em humanos (Heinrichs et al. 2003) quando submetidos a estímulos estressantes. Portanto, é possível afirmar que a liberação central de OT diminui a ansiedade e atenua a resposta do eixo HPA a estímulos psicologicamente estressantes.

### **Sistema Ocitocinérgico**

Como visto acima, o sistema ocitocinérgico está envolvido em interações sociais, podendo estes serem mediados pelos receptores para ocitocina. O sistema ocitocinérgico desempenha um papel central na regulação dos comportamentos sociais em mamíferos (Young & Bielsky 2004) e comportamentos de vínculos, incluindo cuidados maternos e paternos, ligação em pares, investigação social e comportamento sexual. O receptor para OT é uma proteína acoplada à proteína G e está presente nos tecidos periféricos e no SNC (Gimpl & Fahrenholz 2001). Periféricamente existem

receptores para OT em células ósseas, mioblastos, células cardíacas e endoteliais (para revisão, Zingg & Laporte 2003). Sítios de ligação para OT possuem ampla distribuição no cérebro: no sistema olfatório, nos núcleos basais, no sistema límbico, no tálamo, no hipotálamo, algumas regiões corticais, no tronco cerebral e na medula espinhal.

O receptor de ocitocina pode estar associado tanto a proteínas G do tipo Gq/11 como a proteínas Gi, e seus efeitos intracelulares dependem do tipo de acoplamento (Wettschureck et al. 2004a; Wettschureck et al. 2004b; Reversi et al. 2005; Reversi et al. 2006). O OTR apresenta-se comumente oligomerizado na superfície da célula, mesmo na ausência de ligantes, e pode também ser encontrado oligomerizado com receptores da família da vasopressina (V1a e V2).

A maior concentração de receptores é encontrada no núcleo olfatório anterior, hipotálamo ventromedial, amígdala central e no subículo ventral (Reversi et al. 2005). A localização destes sítios de ligação muda de acordo com o desenvolvimento do animal, pois aos 10 dias de idade, os ratos apresentam maior densidade de receptores para OT no córtex cingulado e retrosplenial, na substância gelatinosa do núcleo do trigêmeo, caudado-putâmen, subículo dorsal (Tribollet et al. 1992). Entretanto aos 90 dias, há diminuição ou desaparecimento dos receptores nestes locais. Existem receptores para OT no bulbo olfatório, no tubérculo olfatório e em outros núcleos da amígdala, que podem estar relacionados à percepção ou modulação de estímulos olfativos (Caldwell 1992; Caldwell et al. 1992).

Foram descritos receptores no córtex insular e perirrinal, subículo ventral, caudado-putâmen dorsolateral, núcleo acumbens, septo lateral, núcleo da base da estria terminal, núcleo medial tuberal, complexo mamilar, oliva dorsal, núcleo espinhal trigeminal, núcleo do trato solitário e área tegmental ventral (Pedersen et al. 1995).

Estudos recentes também confirmaram que as primeiras experiências de contato sociais repercutem nas ligações sociais na idade adulta (variação no agrupamento social), experiências comportamentais fora da experiência natural (intervenções neonatais) ou manipulações farmacológicas. Tais repercussões podem ser verificadas nos comportamentos sociais e através de parâmetros bioquímicos em animais adultos (Lukas et al. 2011).

Consideramos que a manipulação neonatal pode repercutir no estabelecimento das primeiras interações sociais dos animais (relação materno-filial e com os irmãos). O sistema ocitocinérgico modula as interações sociais, portanto consideramos que os animais que foram manipulados no período neonatal apresentam alterações em alguma parte deste sistema.

Os receptores de ocitocina são fundamentais nas respostas neuroquímicas do sistema ocitocinérgico, portanto investigamos a quantidade de receptores no córtex frontal, bulbo olfatório e locus coeruleus. Estas estruturas foram escolhidas devido a seu envolvimento em respostas de comportamento e reconhecimento social, afiliação e comportamento maternal (Choleris et al. 2009).

## JUSTIFICATIVA GERAL

Diversos trabalhos estudam as alterações comportamentais, neuroendócrinas e morfológicas que ratos manipulados no período neonatal apresentam na idade adulta. Nosso estudo se diferencia neste aspecto, pois considera a hipótese de que a intervenção neonatal apresenta repercussões já nos períodos iniciais de idade. Esta tese tem como objetivo estudar os efeitos da manipulação neonatal no estabelecimento das relações sociais no período neonatal e puberdade utilizando como parâmetros de avaliação: comportamentos de agregação social, comportamento de brincadeira e a expressão protéica de receptores de ocitocina. O comportamento de brincar parece ser indispensável para o desenvolvimento adequado e o enfrentamento relacionado ao ambiente social, e a capacidade de agregação social uma arena pode ser um indicador precoce de déficits sociais. Este estudo enfatizou verificar se a manipulação neonatal promove alterações ao longo da vida do animal, em suas fases iniciais; no período neonatal e puberdade. A hipótese norteadora desta tese é de que os animais que receberam esta intervenção sofrem alterações em sistemas neurais e desta forma apresentam déficits em comportamentos sociais desde cedo (idades estudadas: 7º, 11º, 25º, 30º e 35º dia de idade). O sistema ocitocinérgico modula as interações sociais, portanto trabalhamos com a hipótese que os animais que foram manipulados no período neonatal apresentam alterações nos receptores de ocitocina. Investigamos a expressão de receptores no córtex frontal, bulbo olfatório e locus coeruleus, pois estas estruturas estão envolvidas em respostas de comportamento de reconhecimento social, afiliação e comportamento maternal (Giovenardi et al 1998; Choleris et al, 2007).

## **HIPÓTESES**

1. A intervenção por manipulação neonatal diminui comportamentos sociais iniciais como a agregação social (7º e 11º dia de idade) e o comportamento de brincadeira (25º, 30º e 35º dias de idade).

2. A intervenção por manipulação neonatal não altera a locomoção dos animais no 11º dia de idade.

3. A intervenção por manipulação neonatal diminui a expressão dos receptores de ocitocina no 11º e 30º dia de idade nas seguintes estruturas cerebrais: córtex cerebral frontal, locus coeruleus e bulbo olfatório.

## **OBJETIVO GERAL**

Esta tese propõe-se a analisar o papel da manipulação neonatal no estabelecimento das relações sociais no período neonatal e puberdade, utilizando como parâmetro o comportamento de brincadeira a agregação social e entre os animais. Além disso, propõe avaliar o possível efeito da manipulação neonatal na expressão protéica de receptores de ocitocina.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

O presente estudo teve como objetivos específicos analisar:

1 O efeito da manipulação neonatal sobre o comportamento de brincadeira em ratos machos e fêmeas aos 25, 30 e 35 dias de idade.

2 O efeito da manipulação neonatal sobre o comportamento de agregação social entre irmãos de mesmo sexo (machos ou fêmeas) de 7 e 11 dias de idade.

3 O efeito da manipulação neonatal sobre a locomoção de filhotes machos e fêmeas de 11 dias de idade.

4 O efeito da estimulação neonatal em ratos machos e fêmeas de 11 e 30 dias de idade no *locus coeruleus*, córtex frontal e bulbo olfatório sobre a expressão protéica de receptores de ocitocina.

## MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

A metodologia descrita a seguir foi utilizada para a realização de todos os experimentos desenvolvidos nesta tese. Porém, o item material e métodos específicos de cada capítulo foram descritos detalhadamente na metodologia específica de cada experimento.

### Manipulação Neonatal

### Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos no biotério sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas com início da fase escura às 17 horas e 30 minutos. Fêmeas prenhas foram trazidas do biotério central da UFRGS ao biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia. O momento do parto foi rigorosamente controlado. No dia seguinte ao nascimento, as ninhadas foram reduzidas a oito filhotes com um mínimo de quatro machos que foram utilizados para coleta do material biológico. Todos os procedimentos utilizados neste estudo foram executados obedecendo as diretrizes de cuidados e uso de animais de laboratório do Instituto Nacional de Saúde que foram aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Protocolo n ° 2007862).



## ESTIMULAÇÃO NEONATAL

### Procedimento de Manipulação Neonatal

Os filhotes foram manipulados cuidadosamente durante 1 minuto por dia do primeiro ao décimo dia pós-natal (PND). A caixa residência era levada para uma sala ao lado, onde a luz ambiente e a temperatura eram semelhantes ao do biotério. A mãe era colocada em outra caixa ao lado da gaiola. O experimentador em seguida, manipulava delicadamente todos os filhotes, simultaneamente, com ambas as mãos cobertas com luvas de látex finos durante 1 minuto. Após tratamento, todos os filhotes foram devolvidos para o ninho ao mesmo tempo e a mãe foi então colocada de volta na caixa residência junto com os neonatos. Os filhotes foram manipulados a uma distância de cerca de 1 metro da mãe. O tempo total de mãe-separação foi de cerca de 2 min. O procedimento foi repetido do 1º ao 10º dia pós-natal no fotoperíodo claro. Este protocolo foi descrito em estudos anteriores (Padoin et al. 2001; Gomes et al. 1999; Lucion et al. 2003; Severino et al. 2004).

**Não-manipulados (grupo controle):** os filhotes não foram tocados pelo experimentador nem pelos tratadores durante os 10 primeiros dias de vida.

**Manipulados crônicos:** os animais foram retirados gentilmente manipulados pelo experimentador por 1 minuto uma vez por dia durante os dez primeiros dias de vida (manipulação repetida).



**Figura 1**

## **CAPÍTULO 1**

### **ESTUDO DO EFEITO DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A AGREGAÇÃO SOCIAL ENTRE IRMÃOS DE 7 E 11 DIAS DE IDADE**

## OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar:

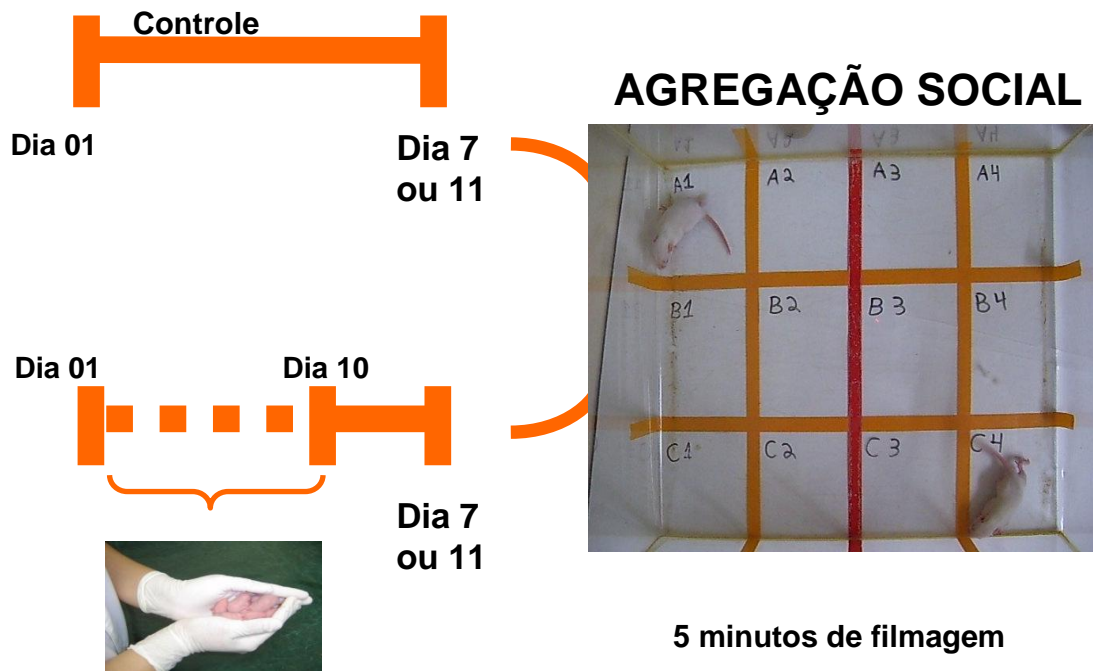
1. O efeito da manipulação neonatal sobre o comportamento de agregação social entre irmãos de mesmo sexo (machos ou fêmeas) no 7º e 11ª dias de idade.

2. O efeito da manipulação neonatal sobre a locomoção de filhotes machos e fêmeas no 11º dia de idade.

## MATERIAL E MÉTODOS

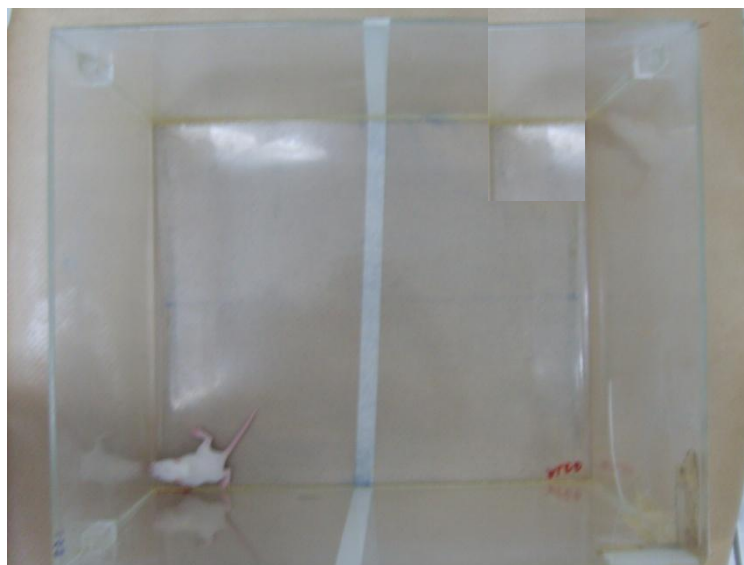
### TESTE PARA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE AGREGAÇÃO SOCIAL

Neste teste é possível avaliar o tempo que o filhote permanece em contato físico direto com o irmão do mesmo sexo bem como a latência deste encontro e o tempo em que permanecem separados. Para isto, foi utilizada uma caixa de acrílico de 40cm de comprimento x 34cm de largura x 24cm de altura transparente. Em um lado foi colocado um dos irmãos e no outro extremo o outro do mesmo sexo. Os filhotes foram monitorados através de uma filmadora por 5 minutos, sendo que em cada sessão de filmagem a caixa foi limpa com álcool 70% e a temperatura da caixa foi monitorada mantendo-a na mesma faixa da temperatura ambiente (23-26°C).



## TESTE DE CAMPO ABERTO EM FILHOTES DE 11 DIAS

Este experimento teve como objetivo verificar se a manipulação neonatal altera o comportamento de locomoção no 7º e 11º dias de idade. Há o registro do tempo que o filhote se locomove assim como sua permanência no mesmo lugar. Para isto, foi utilizada uma caixa de acrílico transparente de 40 cm de comprimento x 34 cm de largura x 24 cm de altura. Em um lado foi colocado um filhote de um dos grupos. Os filhotes foram monitorados através de uma filmadora por 5 minutos, sendo que em cada sessão de filmagem a caixa foi limpa com álcool 70%. A temperatura da caixa foi monitorada sendo mantida entre 24 e 26 °C. Os parâmetros analisados foram a locomoção geral na caixa de acrílico.



## ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Para análise dos comportamentos assumidos durante o registro foram avaliados os seguintes parâmetros:

1. Separados: caracterizados pela ausência de contato físico entre os irmãos do mesmo sexo.
2. Encontro: caracterizado pelo contato físico entre os irmãos do mesmo sexo.
3. Escalada: caracterizado pelo movimento onde o animal apóia-se nas patas traseiras e busca apoio na parede com as patas dianteiras.
4. Parado: caracterizado pela ausência de movimentos relacionados à locomoção.
5. Locomoção: caracterizado pelo movimento realizado pelo animal onde este se locomove de modo a alterar sua posição na caixa de acrílico.

Todas as análises comportamentais deste trabalho foram registradas em fitas VHS, analisadas no programa Noldus® (Holanda) e submetidas à análise estatística para verificação de possíveis diferenças entre os grupos experimentais.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Através do teste de Levene, avaliava-se a heterogeneidade entre as variâncias e quando apropriado foi utilizada a ANOVA Ponderada seguida de Newman Keuls.

## RESULTADOS

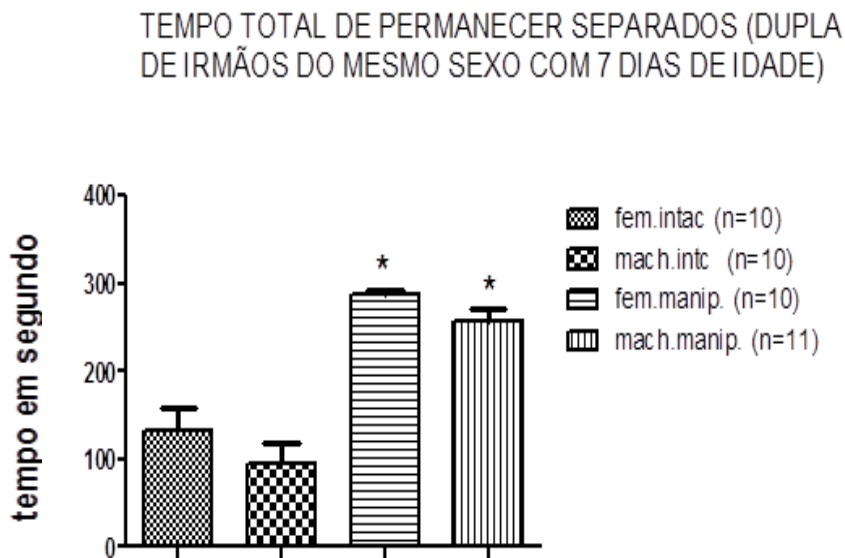
### MÉDIA DO TEMPO SEPARADO NO 7º PND

O Teste de Levene (que indica a homogeneidade de variâncias entre os grupos) resultou na não rejeição da hipótese nula de homogeneidade de variâncias ( $p=0,07$ ).

Não foi detectada interação entre as variáveis sexo e manipulação  $F(1,44)=0,070$ . Porém, há efeito significativo do fator manipulação, ou seja, existe diferença significativa entre as médias do tempo em separado do grupo manipulado  $F(1,44)=139,555$ ;  $p<0,001$ . Há efeito significativo do fator sexo, ou seja, existe diferença significativa entre os níveis do fator sexo  $F(1,44)=6,128$ ;  $p=0,018$ .

A média de tempo em separados das fêmeas (média=201,9) foi significativamente maior que a média de tempo em separados dos machos (média=165,7). A média de tempo em separados no grupo manipulado (média=270,0) foi significativamente maior que no grupo não manipulado (média=97,6). Isto pode ser verificado nos gráficos abaixo:

Figura 3: Comportamento de permanecer separado em filhotes de ratos aos 7 dias de idade





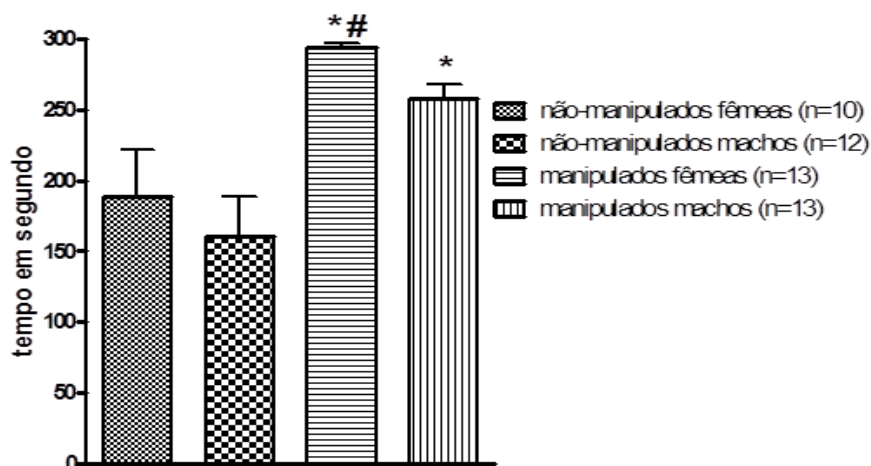
#### MÉDIA DO TEMPO TOTAL DE PERMANECER SEPARADOS NO 11º PND

Nas análises preliminares, através do teste de Levene, detectou-se heterogeneidade significativa entre as variâncias e foram feitas transformações na variável tempo separado 11 dias. Como nenhuma das transformações realizadas resultou em homogeneidade nas variâncias, utilizou-se o método de Mínimos Quadrados Ponderados (Anova Ponderada). O Teste de Levene (que indica a homogeneidade de variâncias entre os grupos) resultou na não rejeição da hipótese nula de homogeneidade de variâncias ( $p = 0,825$ ).

Não foi detectada interação entre as variáveis sexo e manipulação  $F(1,47)=0,036$  ( $p=0,85$ ). Porém, há efeito significativo do fator manipulação, ou seja, existe diferença significativa entre os grupos manipulados e não manipulados  $F(1,47)=20,686$  com  $p<0,001$ . A média de tempo em separados do grupo manipulado (média=275,95) foi significativamente maior que a média de tempo em separados do grupo não manipulado (média=174,8). Não foram constatadas diferenças significativas entre machos e fêmeas (fator sexo)  $F(1,47)=2,151$  com  $p=0,15$ .

Figura 4: Comportamento de permanecer separado em filhotes de ratos aos 10 dias de idade.

#### MÉDIA DO TEMPO TOTAL DE PERMANECER SEPARADOS (DUPLA DE IRMÃOS DO MESMO SEXO COM 11 DIAS DE IDADE)

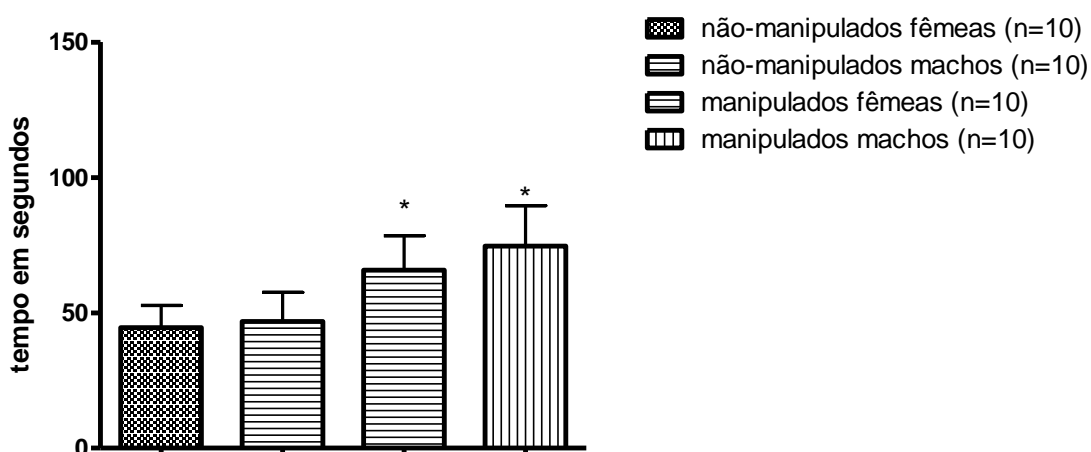


## MÉDIA DO TEMPO DE LOCOMOÇÃO NO 11º PND

Não foi detectada interação entre as variáveis sexo e manipulação ( $F(1,39)=0,076$ ;  $p=0,78$ ). Porém há efeito significativo do fator manipulação, ou seja, existe diferença significativa entre os níveis do fator Manipulação ( $F(1,39)=4,271$ ;  $p=0,046$ ). Não foram constatadas diferenças entre machos e fêmeas (fator Sexo  $F(1,39)=0,218$ ;  $p=0,64$ )

A média do tempo de locomoção do grupo manipulado (média=45,6) foi significativamente maior que o tempo médio do grupo não-manipulado (média=70,2). Isto pode ser verificado no gráfico abaixo:

Figura 5: Duração de locomoção em filhotes de ratos aos 11 dias de idade.  
Tempo Total de Locomoção em Campo Aberto de ratos machos e fêmeas de 11 dias de idade



## DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste capítulo demonstraram que o protocolo da manipulação neonatal alterou o comportamento de agregação social de ratos machos e fêmeas submetidos a este procedimento. Os ratos que foram submetidos à manipulação neonatal apresentaram aumento no tempo de permanecer separado do irmão do mesmo sexo quando comparados com o grupo não manipulado, nas idades estudadas (7 e 11 dias de idade duas idade). Além disto, as fêmeas manipuladas (com idade de 11 dias) apresentam um tempo maior de permanecerem separadas quando comparada a machos manipulados.

Para discutir os resultados sobre agregação social devemos compreender que quando separados de suas mães, os filhotes sinalizam para a mãe recolhê-los através de dicas olfativas, visuais e auditivas, portanto tais sinais também devem estar envolvidos no comportamento da ninhada em agregar-se e deveriam ser avaliados para que houvesse uma compreensão do fenômeno de maneira mais completa. Em ratos, foi sugerido que principalmente até o 10<sup>o</sup> dia pós-parto, os filhotes apresentam uma circuitaria neural peculiar adaptada a desenvolver um forte apego pela mãe, não importando a qualidade de cuidado materno recebido (Moriceau et al. 2010; Rainecki et al. 2010). Filhotes de ratos que foram lambidos e afagados freqüentemente por suas mães apresentam liberação de OT (Pedersen & Boccia 2002). Há evidência de que a OT endógena durante o período neonatal tenha efeitos organizadores na expressão do comportamento adulto.

Conforme Todeschin et al. (2009) a manipulação neonatal induziu alterações nos comportamento sociais reduzindo o tempo de investigação social de ratos machos nos testes de memória social e interação social. Estes resultados também apresentam

diferença sexual, pois fêmeas submetidas ao teste de interação social não apresentam diferença em relação ao grupo não manipulado (Todeschin et al. 2009). Podemos estabelecer uma relação entre nossos resultados e os de Todeschin et al. (2009) já que o comportamento de agregação social é considerado por alguns autores como precursor do comportamento de reconhecimento e investigação social.

Esta diminuição na capacidade de agregação em grupos de contato é um indicador precoce de déficit social (Schank 2008). Assim, podemos afirmar que a manipulação neonatal desde cedo altera as interações sociais dos animais que foram submetidos a esta intervenção neonatal já que o surgimento da atividade acoplada ao contexto de grupo é um indicador do surgimento de comportamento social (Schank & Alberts 2000). Os filhotes nestas idades são altriciais, orientando-se ainda apenas pela olfação.

No teste que avalia a capacidade de agregação social temos como hipótese que o fator determinante para que haja o encontro dos filhotes na arena (onde é realizado o teste) é capacidade de aprendizagem olfatória. Podemos relacionar os resultados obtidos neste capítulo com os de Rainecki et al. (2009) que demonstraram que a manipulação neonatal causa uma redução na preferência pelo odor do ninho apenas em fêmeas e aos 7 dias de vida. Portanto, sugerimos que a diminuição do comportamento de agregação social verificados nos filhotes de 7 e 11 dias de idade esteja relacionada com a redução da preferência pelo odor do ninho. O reconhecimento do odor maternal é fundamental para sobrevivência de filhotes altriciais como ratos, pois eles dependem da mãe para proteção, manutenção da temperatura corporal e alimentação. Essa identificação da mãe ocorre devido ao aprendizado olfatório, que se dá pelo pareamento do cuidado maternal (estímulo tátil) com o cheiro da mãe (Leon 1992).

Entretanto, nossos resultados se diferenciam dos resultados de Rainecki et al. (2009) pois machos como fêmeas manipulados quando comparados com animais não-manipulados apresentam resultados que indicam uma diminuição da agregação social. Sugerimos que o mecanismo que esteja envolvido no comportamento da agregação social seja mediado por outras estruturas. Talvez não somente pelo aprendizado olfatório. Seria importante avaliar também a motricidade destes animais no mesmo contexto dos testes comportamentais aqui discutidos.

A manipulação neonatal afeta o comportamento materno, pois aumenta o cuidado parental (Pryce et al. 2001) esta alteração na relação mãe-filhote pode estar relacionada com o resultado diminuído apresentado pelo grupo manipulado no comportamento de agregar-se. Conforme Liu et al. (1997) as ratas mães de filhotes que tiveram seus filhotes manipulados permanecem mais tempo cuidando da sua prole, um dos comportamentos alterados é o de lambe os filhotes (há um aumento neste comportamento).

Outro fator que pode estar envolvido com esta alteração no comportamento de agregação social de ratos machos e fêmeas manipuladas é sua motricidade. Para isto realizamos o teste do campo aberto nos animais aos 11 dias de idade. Observamos diferenças significativas entre as médias do tempo total de locomoção. O que pode nos permitir concluir que nossos resultados sobre agregação social estão enviesados por alterações na motricidade dos filhotes manipulados. O campo aberto utilizado foi quadrado, o que possibilita aos animais a permanência nos cantos. Seria importante analisar esses mesmos comportamentos num campo aberto redondo. Os fatores que podem estar relacionados a maior locomoção que encontramos nos filhotes manipulados devem ser melhor investigados. Outra possibilidade para o aumento da locomoção nos filhotes manipulados seria geração de calor, como compensação ao fato

de terem uma redução da agregação social. De qualquer forma, é interessante notar que a manipulação aumenta locomoção de ratos adultos em campo aberto (quadrado ou redondo), e aqui mostramos que nos filhotes de 11 dias também constatamos esse efeito.

## **CAPÍTULO 2**

# **EFEITOS DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE OS COMPORTAMENTOS BRINCADEIRA EM RATOS JUVENIS**

## OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar:

1. O efeito da manipulação neonatal sobre o comportamento de brincadeira no 25º, 30º e 35º dia de idade.



## REGISTRO E ANÁLISE DOS COMPORTAMENTOS DE BRINCADEIRAS

Para o registro do comportamento de brincadeira foram utilizadas caixas residência de acrílico transparentes de 40 cm de comprimento x 34 cm de largura x 24 cm de altura onde havia maravalha limpa e acesso a ração e água. As observações foram realizadas dentro do biotério onde os animais foram mantidos desde o nascimento. Os animais foram separados da mãe após o desmame e agrupados em colônias compostas por 4 machos ou 4 fêmeas irmãos entre si. O registro comportamental consistiu de 25 observações pontuais no tempo total de 1 hora e 12 minutos onde foram anotados em uma planilha os comportamentos de brincadeira de 36 colônias. Os horários dos registros foram: 15, 18, 20 e 21 e 30 horas. Em cada período os comportamentos de brincadeira foram observados e registrados a cada 3 minutos (25 observações por período x 4 períodos por dia = 100 observações/colônia/dia).

Os seguintes comportamentos de brincadeira (Meaney & Stewart 1981) foram registrados:

**“Atacar”**: quando um animal empurra o outro animal esfregando o nariz na nuca ou no dorso de outro animal.

**Rolar (“Wrestling”)**: Dois animais rolam e tombam um com o outro.

**Boxe**: Dois animais em pé de frente para o outro realizam movimentos de boxear em direção ao outro.

**Postura de exposição ventral**: Um animal encontra-se de costas (no chão) totalmente ao outro animal, expondo sua superfície ventral para outro animal.

**Pular**: animal executa seqüência de saltos curto perto do chão.

**Perseguir (“Chasing”)**: Um animal a correr em direção a outro animal que se move no sentido oposto.

**Cheirar**: Um animal cheirar a região anogenital de outro animal.



Figura 2



Figura 3

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizada ANOVA de duas vias (sexo e manipulação), seguida pelo teste de Bonferroni post hoc. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Em todos os testes, o nível de significância estatística foi de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Comportamentos de Brincadeira

#### **“Atacar” no 25º, 30º e 35º dias de idade.**

Efeitos principais da manipulação e sexo foram encontrados no comportamento de “pouncing” nas três idades estudadas (Figura 1). A manipulação neonatal reduziu a frequência de pouncing quando comparados com os animais não manipulados no PND 25 ( $F(1, 33) = 37,78, p < 0,001$ ), PND 30 ( $F(1, 33) = 27,36, p < 0,001$ ), e PND 35 ( $F(1, 33) = 67,80, p < 0,001$ ). Como esperado, os machos apresentaram uma maior frequência de pouncing que as fêmeas no PND 25 ( $F(1, 33) = 12,08, p < 0,001$ ), PND 30 ( $F(1, 33) = 14,04, p < 0,001$ ), e PND 35 ( $F(1, 33) = 27,25, p < 0,001$ ). Não foram verificados efeitos de interação significativa entre tratamento e sexo no PND 25 ( $F(1, 33) = 0,02$ ) PND e 30 ( $F(1, 33) = 0,41$ ). No entanto, uma interação significativa entre os fatores foi observada no PND 35 ( $F(1, 33) = 19,95, p < 0,001$ ), em que o efeito de tratamento foi maior pronunciada nos machos do que nas fêmeas, apesar de a intervenção reduziu o comportamento em ambos.

#### **“Perseguir” nos 25, 30 e 35 dias de idade.**

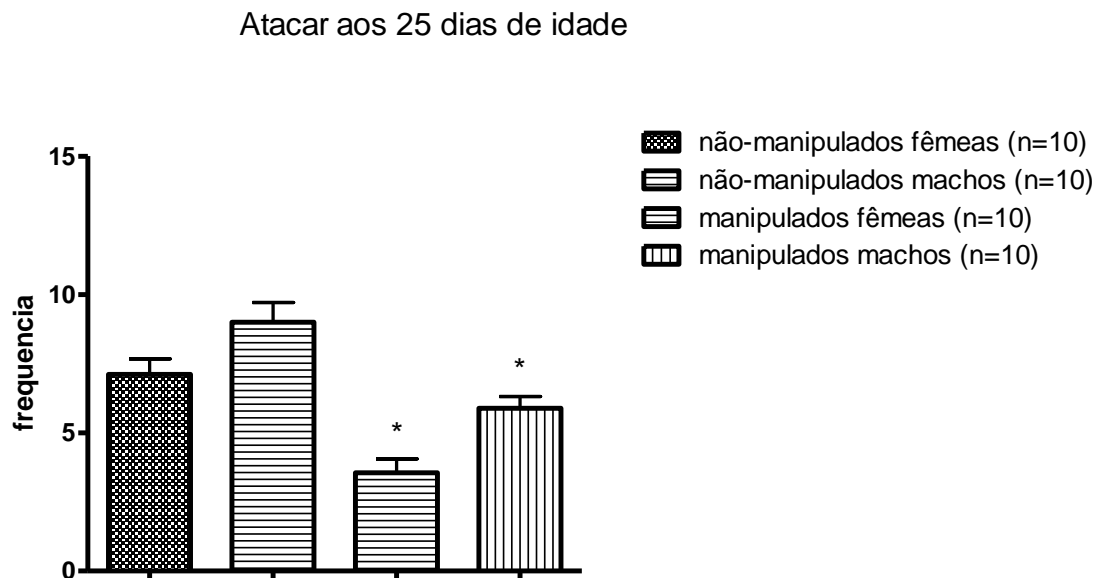
Efeitos principais da manipulação e sexo foram encontrados no comportamento de “perseguir” nas três idades estudadas (Tabela 1). A manipulação neonatal reduziu a frequência de perseguir no PND 25 ( $F(1, 33) = 8,87, p < 0,01$ ), PND 30 ( $F(1, 33) =$

17,38,  $p < 0,001$ ), e PND 35 ( $F(1, 33) = 27,99$ ,  $p < 0,001$ ). No que diz respeito às diferenças sexuais, os machos se envolvem em mais em perseguir do que as fêmeas no PND 25 ( $F(1, 33) = 7,71$ ,  $p < 0,01$ ), PND 30 ( $F(1, 33) = 53,93$ ,  $p < 0,001$ ), e PND 35 ( $F(1, 33) = 4,40$ ,  $p < 0,05$ ). Não foi detectada interação significativa entre a manipulação e sexo em qualquer das idades estudadas (PND 25,  $F(1, 33) = 0,46$ ; PND 30,  $F(1, 33) = 1,06$ ; PND 35,  $F(1, 33) = 0,53$ ).

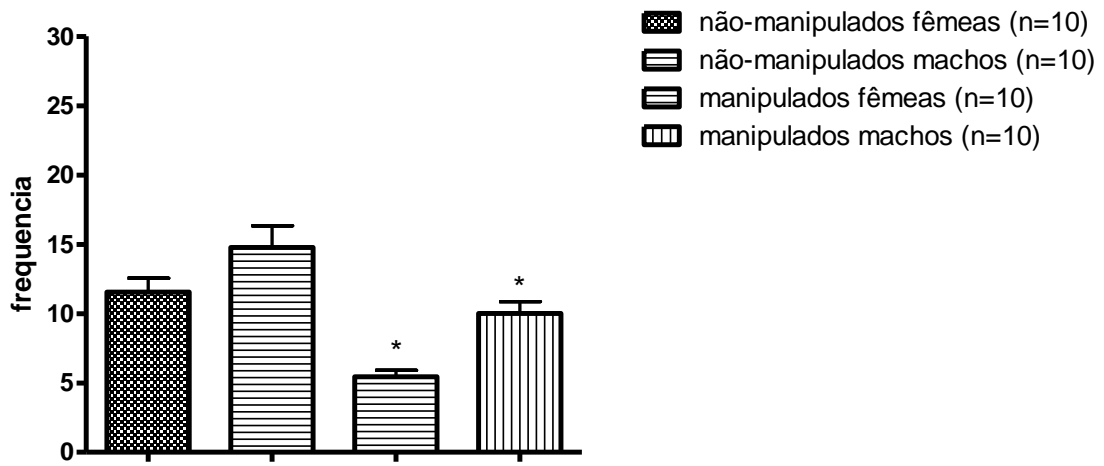
### **Rolar (“wrestling”) nos 25, 30, e 35 dias de idade.**

Efeitos principais da manipulação e sexo foram encontrados no comportamento de “rolar” nas três idades estudadas (Tabela 1). A manipulação neonatal reduziu a frequência de rolar no PND 25 ( $F(1, 33) = 13,09$ ,  $p < 0,01$ ), PND 30 ( $F(1, 33) = 7,48$ ,  $p < 0,001$ ), e PND 35 ( $F(1, 33) = 7,27$ ,  $p < 0,001$ ). O efeito principal do sexo não foi significativo no 25º PND ( $F(1, 33) = 4,35$ ,  $p = 0,05$ ), mas os machos se envolvem mais em “rolar” do que as fêmeas, como esperado, no PND 30 ( $F(1, 33) = 10,18$ ,  $p < 0,01$ ) e PND 35 ( $F(1, 33) = 7,27$ ;  $p < 0,01$ ). Nenhuma interação significativa foi detectada entre tratamento e sexo em qualquer uma das idades (PND 25,  $F(1, 33) = 0,36$ ; PND 30,  $F(1, 33) = 1,87$ ; PND 35,  $F(1, 33) = 3,48$ ).

Figura 1. “Atacar” no 25º, 30º, e 35º PND . Média ( $\pm$  SEM) frequências de pouncing, comparação entre machos e fêmeas NH (não manipulados) e H (manipulados). Utilizou-se ANOVA (manipulação e sexo como fatores; teste post hoc (Bonferroni)) e demonstrouse que a manipulação neonatal (1 min a manipulação diária do PND 1-10) reduziu a quantidade de pouncing em todas as idades ( $p < 0,05$ ), independentemente do sexo. Além disso, como esperado os machos apresentam uma frequência de pouncing aumentada quando comparados com as fêmeas ( $p < 0,05$ ), independentemente da manipulação. Não-manipulados machos ( $n = 9$ ), não-manipuladas fêmeas ( $n = 9$ ), machos manipulados ( $n = 9$ ), fêmeas manipuladas ( $n = 9$ ). \* Representa diferença entre animais manipulados e não-manipulados.



### Atacar aos 30 dias de idade



### Atacar aos 35 dias de idade

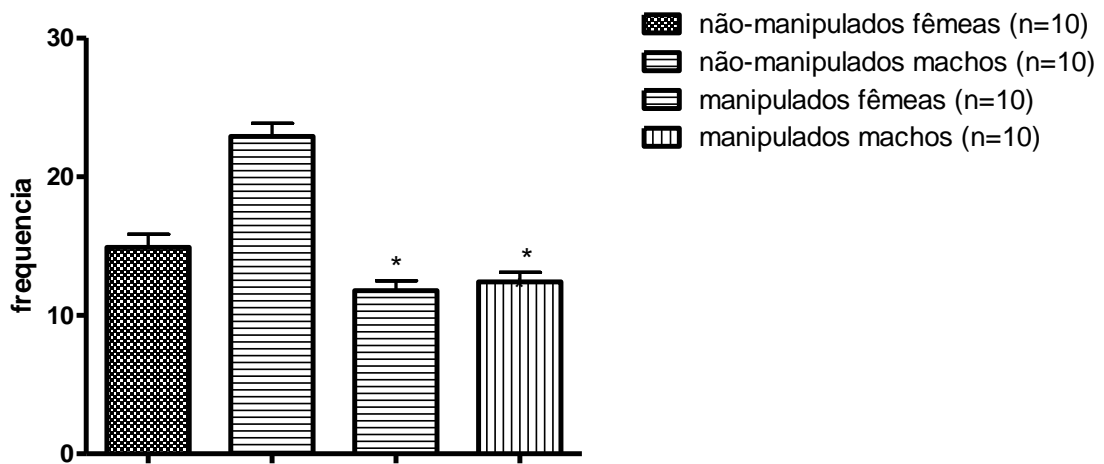


Tabela 1. Resultados descritivos de “Perseguir” e “Rolar” no 25º, 30º e 35º PND. A média (+ SEM) da frequência dos comportamentos do grupo não manipulado (NH) e manipulado (H) ratos machos (♂) e fêmeas (♀).

Comportamento			25 PND	30 PND	35 PND
			Média ( $\pm$ SEM)	Média ( $\pm$ SEM)	Média ( $\pm$ SEM)
Perseguir	NH	♂	3.1 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 0.5	5.7 $\pm$ 0.8
		♀	1.7 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.4
	H	♂	1.7 $\pm$ 0.4*	2.9 $\pm$ 0.2*	2.7 $\pm$ 0.3*
		♀	0.8 $\pm$ 0.3*	0.8 $\pm$ 0.2*	2.0 $\pm$ 0.2*
Rolar	NH	♂	2.0 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.2
		♀	1.3 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.3
	H	♂	1.6 $\pm$ 0.3*	2.0 $\pm$ 0.2*	2.1 $\pm$ 0.2*
		♀	1.1 $\pm$ 0.3*	1.0 $\pm$ 0.2*	1.8 $\pm$ 0.2*
Pular	NH	♂	12.2 $\pm$ 0.7	18.5 $\pm$ 1.5	15.3 $\pm$ 0.9
		♀	8,0 $\pm$ 0,7	14.1 $\pm$ 1.0	13.0 $\pm$ 0.9
	H	♂	7.2 $\pm$ 0.6*	10.7 $\pm$ 0.5*	8.9 $\pm$ 0.9*
		♀	4.6 $\pm$ 0.7*	8.5 $\pm$ 0.6*	6.3 $\pm$ 1.0*

\* Representa diferença entre animais manipulados e não manipulados.



## DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste capítulo demonstraram que o protocolo da manipulação neonatal alterou a manifestação do comportamento de brincar de ratos machos e fêmeas submetidos a este procedimento. Os ratos que foram submetidos a manipulação neonatal apresentaram comportamentos de brincar reduzidos quando comparados com os animais não-manipulados (nas três idades estudadas).

As interações sociais em humanos são importantes para o desenvolvimento adequado do indivíduo. Essas interações parecem ocorrer principalmente na adolescência. Isto ocorre também com ratos, onde este período parece ser onde estas interações ocorrem em maior frequência. Além disso, as interações sociais nos ratos são sensíveis a fatores ambientais (Varlinskaya & Spear 2008).

As alterações que a manipulação neonatal promove no comportamento de brincadeira devem ser considerado uma repercussão bastante importante tanto por ser uma evidência de que esta intervenção realmente perturba o desenvolvimento do SNC como apresenta uma repercussão imediata na vida do animal.

Sabe-se que os animais manipulados têm alterações comportamentais ao longo prazo, entre as quais se encontra um aumento da atividade exploratória e atenuação do medo quando expostos a ambientes novos (Padoin et al. 2001; Severino et al. 2004; Madruga et al. 2006) assim como as fêmeas manipuladas apresentam receptividade sexual diminuída (Padoin et al. 2001) e machos manipulados apresentam diminuição do comportamento sexual (Padoin et al. 2001; Benetti et al. 2007) durante a idade adulta.

Tais alterações comportamentais apresentados pelos animais manipulados na idade adulta podem estar relacionadas com resultados no comportamento de brincar apresentados por estes animais no período juvenil. A manipulação neonatal também

reduz um tipo específico de comportamento social, que é o comportamento de interação social em ratos machos adultos (Todeschin et al. 2009) o que também é um dado interessante que podemos relacionar com os dados verificados neste capítulo.

A brincadeira é uma atividade indispensável para o desenvolvimento adequado de enfrentamento relacionado com o ambiente social (Hol et al. 1999; van den Berg et al. 1999). Ratos jovens que foram privados de interações sociais durante a quarta e quinta semanas de vida (que é o período em que a brincadeira social em ratos atinge o pico) (Meaney & Stewart 1981) apresentaram decréscimo da atividade social (incluindo o comportamento sexual), mas a atividade locomotora ou o desempenho do animal no teste de cruz elevada sem alterações.

Ward & Stehm (1991) verificaram que o estresse pré-natal da mãe provoca diminuição da brincadeira em ratos machos. Pode-se relacionar a alteração no comportamento da mãe de filhotes manipulados com o comportamento de brincadeira diminuído destes animais. Existem diversos estudos que demonstram que o desmame precoce aumenta o temor e agressão na vida adulta e diminui o comportamento de brincar em animais jovens (Kikusui et al. 2004; Kikusui et al. 2005).

De maneira semelhante com alterações no ambiente a privação social, a manipulação neonatal induz déficits em comportamentos sociais iniciais revelando ter um efeito determinante sobre o desenvolvimento do comportamento social em ratos. Curiosamente, a privação de animais da oportunidade de brincar faz com que eles desenvolvam padrões de comportamentos sociais anormais em relação à modulação da agressividade e ao início de tais comportamentos (Einon et al. 1978; Hole et al. 1991).

Um aumento da oportunidade para a brincadeira social é uma característica comum de procedimentos de enriquecimento ambientais que envolvem aumento da complexidade social em relação às condições de habitação padrão. Uma alternativa para

reverter os efeitos da manipulação neonatal poderia ser o enriquecimento ambiental no sentido de aumentar as oportunidades de brincar com animais de mesma idade.

As áreas corticais têm papel fundamental na regulação do comportamento de brincadeira. A retirada do córtex em ratos em idade neonatal não afeta o começo do comportamento de brincar, mas os animais descorticados se apresentaram hiperativos. Os animais descorticados apresentam um comportamento de brincar mais adulto, ou seja, apresentam posturas menos propensas a interações diminuindo o tempo e frequência de brincadeira. Assim, em ratos, o neocórtex é apontado como uma estrutura principal envolvida na facilitação, mas não a iniciação do brincar (Panksepp et al. 1994; Pellis et al. 1992).

A manipulação promove uma diminuição no número de neurônios das camadas 2 e 3 do córtex frontal no 11º dias de idade em ratos machos e fêmeas (Lucion et al, 1999). Sugerimos, portanto, que a diminuição nos comportamentos de brincadeira que verificamos nesta tese esteja relacionada aos resultados de Lucion et al. (1999) que indicam a diminuição dos números de neurônios no córtex frontal nos 11º dia de idade. Rainecki et al. (2009) mostraram que ratos machos e fêmeas manipulados no período neonatal apresentam uma redução da atividade de noradrenérgica no bulbo olfatório aos 7 dias de idade.

Conforme Veyrac et al. (2005) alterações no sistema noradrenérgico podem causar danos no funcionamento adequado do SNC. O não reconhecimento do odor da mãe pelo filhote pode ser devido a uma redução na atividade noradrenérgica no bulbo olfatório, o que altera a formação da memória de preferência de odor.

Sistemas noradrenérgicos, através do seu envolvimento na motivação e atenção (Lorden et al. 1980; Dahlstrm & Fuxel 1964) podem estar envolvidos na regulação do comportamento de brincadeira. Propomos que o déficit no reconhecimento olfatório

que os animais manipulados apresentam possa estar relacionado com a diminuição do comportamento de brincar nas idades estudadas.

O presente estudo não analisa o comportamento da mãe, no entanto, estudos anteriores em nosso laboratório (De Azevedo et al. 2010) e outros (Villescas et al. 1977; Champagne et al. 2003) têm mostrado um comportamento aumentado de lambe imediatamente após a manipulação neonatal, no entanto, uma análise mais detalhada mostrou que a intervenção também diminui o contato mãe-bebê, e depois da manipulação a mãe fica mais frequentemente fora do ninho (longe dos filhotes) quando comparadas com mães cujos filhotes não foram manipulados (Reis et al. 2011). Tais alterações no comportamento maternal que a manipulação neonatal promove podem estar envolvidas nos déficits sociais apresentados pelos filhotes.

Diversos autores sugerem que o comportamento de brincadeira é fundamental para o desenvolvimento social dos animais o que justifica que haja mais pesquisas para entender os fenômenos neurobiológicos envolvidos nos sistemas neurais que promovem este comportamento. Além disso, o comportamento de brincadeira deve ser investigado pela sua relação com distúrbios psiquiátricos como autismo, déficit de atenção e hiperatividade, depressão e esquizofrenia.

Nossos resultados evidenciam a importância da experiência precoce como moduladora das respostas comportamentais sociais ainda no período neonatal e na puberdade. Com base nos nossos resultados sobre os efeitos da manipulação neonatal sobre o comportamento de brincar, o capítulo sobre a expressão protéica (Western Blot) de receptores de ocitocina buscará estabelecer relações e esclarecimentos sobre os mecanismos da biologia molecular envolvidos nas alterações no ambiente neonatal.

## **CAPÍTULO 3**

**EFEITOS DA MANIPULAÇÃO NEONATAL SOBRE A EXPRESSÃO PROTÉICA DE RECEPTORES DE OCITOCINA NO CÓRTEX CEREBRAL FRONTAL, LOCUS COERULEUS, E BULBO OLFATÓRIO NO 11º E 30º DIAS DE IDADE**

## OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da estimulação neonatal em ratos machos e fêmeas de 11 e 30 dias de idade na *locus coeruleus*, córtex frontal e bulbo olfatório sobre a expressão proteica de receptores de ocitocina utilizando a técnica do western blot.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Obtenção do Material Biológico

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Cristália) na dose de 50 mg/Kg, via intraperitoneal.

### Córtex Pré-Frontal e Bulbo Olfatório

Os animais foram sacrificados por decapitação (com tesoura adequada os animais de 11 dias e guilhotina os animais de 30 dias). O encéfalo foi rapidamente removido e colocado sobre placa de Petri invertida sobre gelo. A seguir com auxílio de material cirúrgico uma fatia de bulbo olfatório e do córtex pré-frontal foi removida e congelada e mantidas a 70°C negativos.

### Obtenção do *Locus Coeruleus* pela Técnica de “Punch”

Após a decapitação, os encéfalos foram retirado e congelado no isopentano 99% p.a (Vetec) em gelo seco e armazenado em -70°C. Para retirar o *locus coeruleus* foi utilizada a técnica de *punch* descrita por Palkovits (1973). As coordenadas para localização dos núcleos foram obtidas com o auxílio do atlas para o encéfalo de ratos Paxinos & Watson (1997). Os encéfalos dos ratos foram fixados pela parte posterior no criostato e os cortes foram realizados da região anterior para a posterior. A temperatura interna do criostato foi mantida em  $-15 \pm -1^{\circ}\text{C}$ . Para a retirada da *locus coeruleus*

localizou-se o ponto – 9.16 mm do Bregma e se fez um corte de 10 µm. Dessa fatia foi retirado um punch da *Locus coeruleus* com o auxílio de uma agulha (0.60x25).

#### Análise da expressão protéica (*Western Blot*)

Após quantificação de proteínas (Bradford 1976), estas foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio). O homogeneizado foi colocado em cada poço com tampão de carga e o padrão de peso molecular correu no mesmo gel. As amostras foram aquecidas a 100°C por 2 minutos antes de carregar o gel. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose usando um sistema de transferência (mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell), a 110 V por 1-2 h. As membranas foram incubadas com leite em pó 8% em tampão tris salino contendo 0,1% de tween 20 (TTBS) por 90 min, com o objetivo de bloquear ligações inespecíficas. Após 3 lavagens com TTBS as membranas foram incubadas por 16 a 18 horas (a 4°C) com o anticorpo primário anti-receptor de ocitocina (marca comercial Santa Cruz) diluído em TTBS (1:500). A incubação com o anticorpo secundário (1:10000) em temperatura ambiente iniciou após 3 lavagens com TTBS e teve duração de 2 horas. Todas as incubações foram realizadas sob agitação constante. Antes de proceder à revelação por quimiluminescência, as membranas foram lavadas por três períodos de 10 minutos cada com TBS (TrisHCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). A reação de quimiluminescência ocorreu pelo uso de um sistema de detecção baseado em substratos luminescentes, com exposição das membranas ao filme radiográfico Hyperfilm (Amersham) por aproximadamente 1 minuto. A autorradiografia gerada foi analisada por meio do software Imaje J. Os



resultados de cada membrana foram relativizados aos valores encontrados com a incubação das mesmas com o anticorpo primário anti GAPDH (1:1000).

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada uma ANOVA de duas vias (sexo e manipulação) seguida pelo teste de Bonferroni post hoc. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Em todos os testes, o nível de significância estatística foi de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

Quantificação dos Receptores de Ocitocina no Córtex Pré-Frontal, Locus Coeruleus e Bulbo Olfatório em ratos machos e fêmeas.

Córtex Pré-Frontal no 11° e 30 °dia de idade

A média da quantidade de receptores de ocitocina no córtex pré-frontal do grupo não manipulado não foi significativamente diferente quando comparados ao grupo manipulados no 11° dia de idade [efeito principal manipulação  $F(1,22)=0,461$ ]; nem quanto ao efeito sexo [efeito principal sexo  $F(1,22)=0,175$ ]. A interação entre os fatores não atingiu significância estabelecida [ $F(1,22)=0,094$ ].

A média da quantidade de receptores de ocitocina no córtex pré-frontal do grupo não manipulado não foi significativamente diferente quando comparados ao grupo manipulados no 30° dia de idade [efeito principal manipulação  $F(1,24)=1,790$ ]; nem quanto ao efeito sexo [efeito principal sexo  $F(1,24)=2,528$ ]. A interação entre os fatores não atingiu significância estabelecida [ $F(1,24)=2,670$ ].

Locus Coeruleus no 11° e 30 °dia de idade

A média da quantidade de receptores de ocitocina no locus coeruleus do grupo não manipulado não foi significativamente diferente quando comparados ao grupo manipulados no 11° dia de idade [efeito principal manipulação  $F(1,29)=2,923$ ]; nem quanto ao efeito sexo [efeito principal sexo  $F(1,29)=0,118$ ]. A interação entre os fatores não atingiu significância estabelecida [ $F(1,29)=0,216$ ].

A média da quantidade de receptores de ocitocina no locus coeruleus do grupo não manipulado não foi significativamente diferente quando comparados ao grupo manipulados no 30° dia de idade [efeito principal manipulação  $F(1,26)=0,234$ ]; nem

quanto ao efeito sexo [efeito principal sexo  $F(1,26)=0,393$ ]. A interação entre os fatores não atingiu significância estabelecida [ $F(1,26)=0,428$ ].

#### Bulbo Olfatório no 11° e 30° dia de idade

A média da quantidade de receptores de ocitocina no bulbo olfatório do grupo não manipulado não foi significativamente diferente quando comparados ao grupo manipulados no 11° dia de idade [efeito principal manipulação  $F(1,15)=0,261$ ]; nem quanto ao efeito sexo [efeito principal sexo  $F(1,15)=1,639$ ]. A interação entre os fatores não atingiu significância estabelecida [ $F(1,15)=3,783$ ].

A média da quantidade de receptores de ocitocina no bulbo olfatório do grupo não manipulado é maior quando comparados ao grupo manipulados no 30° dia de idade [efeito principal manipulação  $F(1,17)=4,981$ ,  $p=0,042$ ]. Não houve diferença entre machos e fêmeas [efeito principal sexo  $F(1,17)=1,554$ ]. A interação entre os fatores não atingiu significância estabelecida [ $F(1,17)=0,283$ ].

Figura 1. Córtex Pré-Frontal 11 dias – Concentração de Receptores de Ocitocina em fêmeas (F) e machos (M)

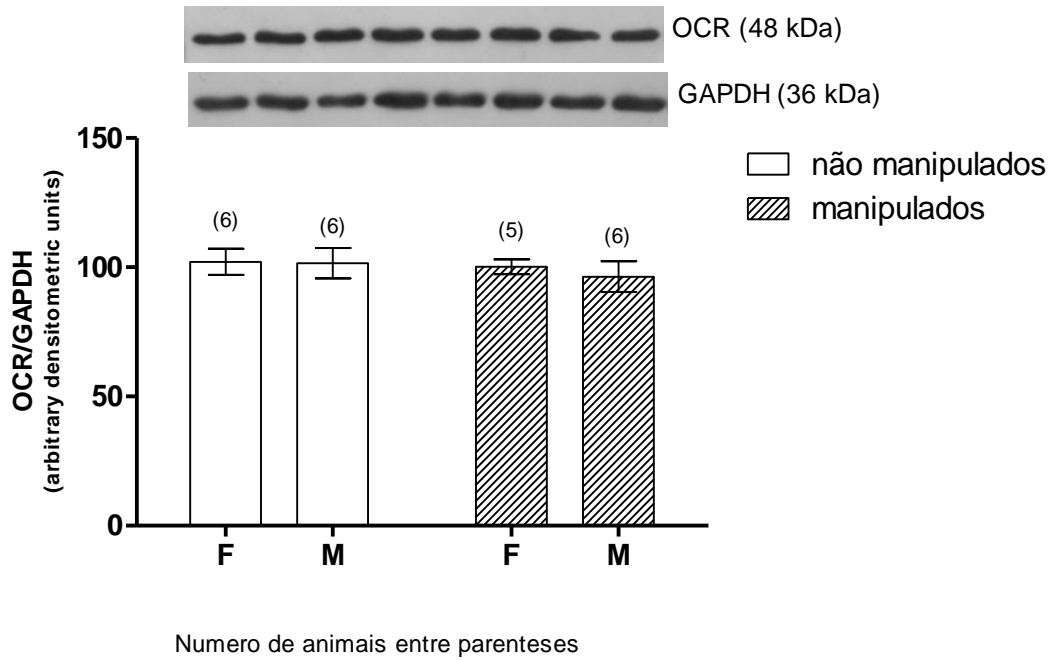


Figura 2. Córtex Pré-frontal 30 dias: Concentração de Receptores de Ocitocina em fêmeas (F) e machos (M)

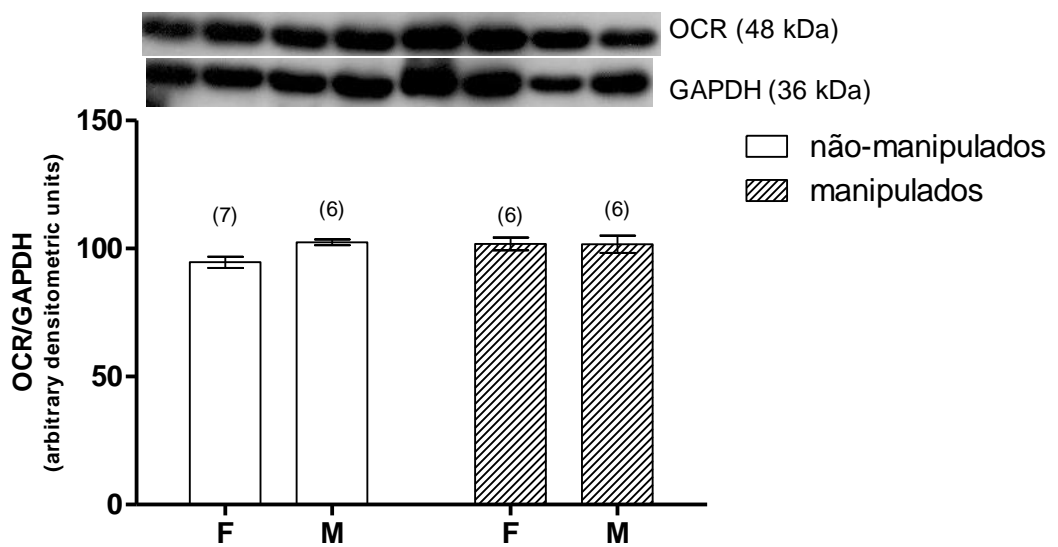


Figura 3. Locus Coeruleus 11 dias: Concentração de Receptores de Ocitocina em fêmeas (F) e machos (M)

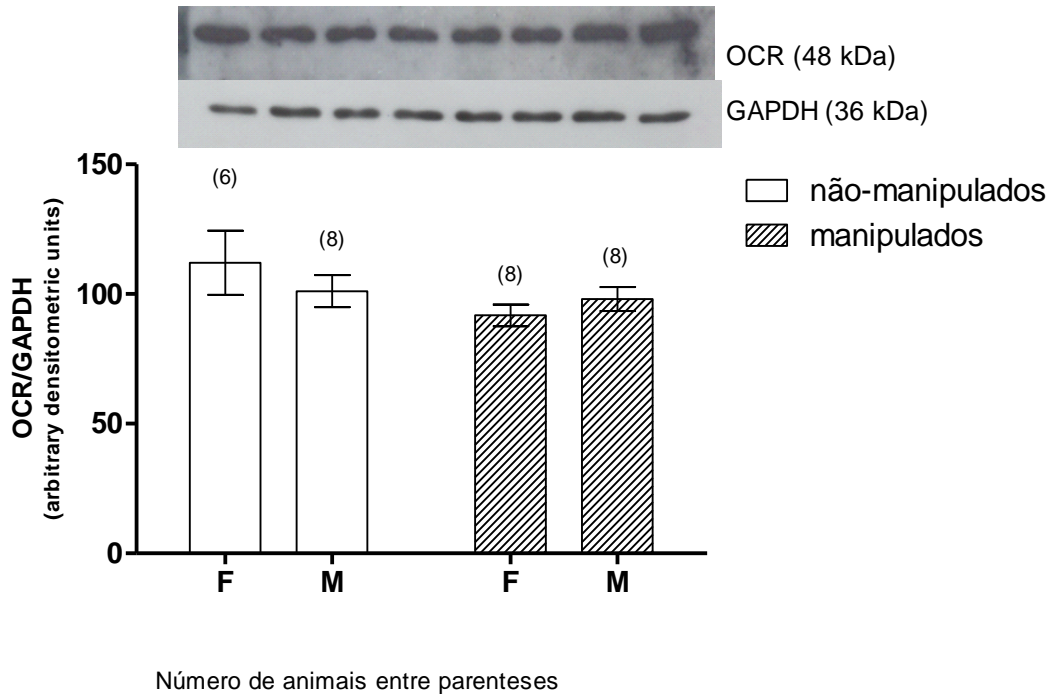


Figura 4. Locus Coeruleus 30 dias: Concentração de Receptores de Ocitocina em fêmeas (F) e machos (M)

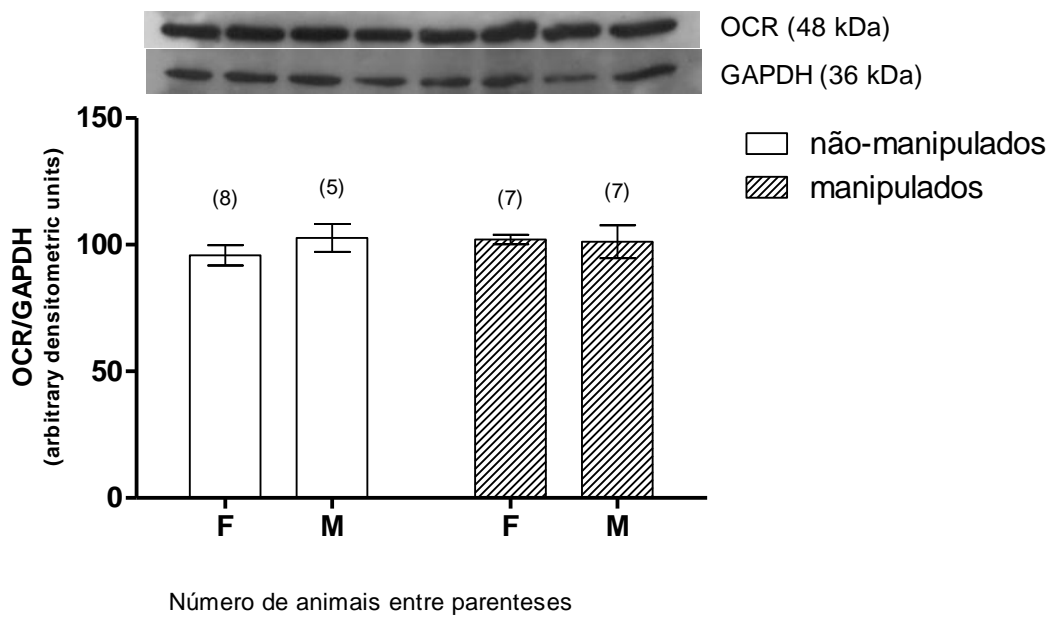


Figura 5. Bulbo Olfatório 11 dias: Concentração de Receptores de Ocitocina em fêmeas (F) e machos (M)

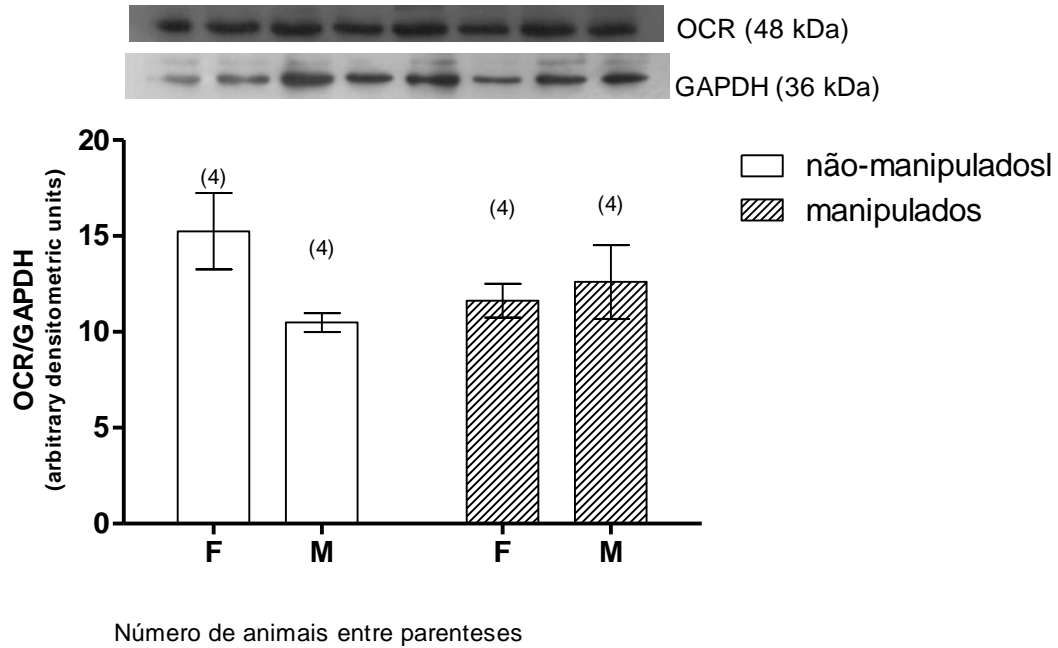
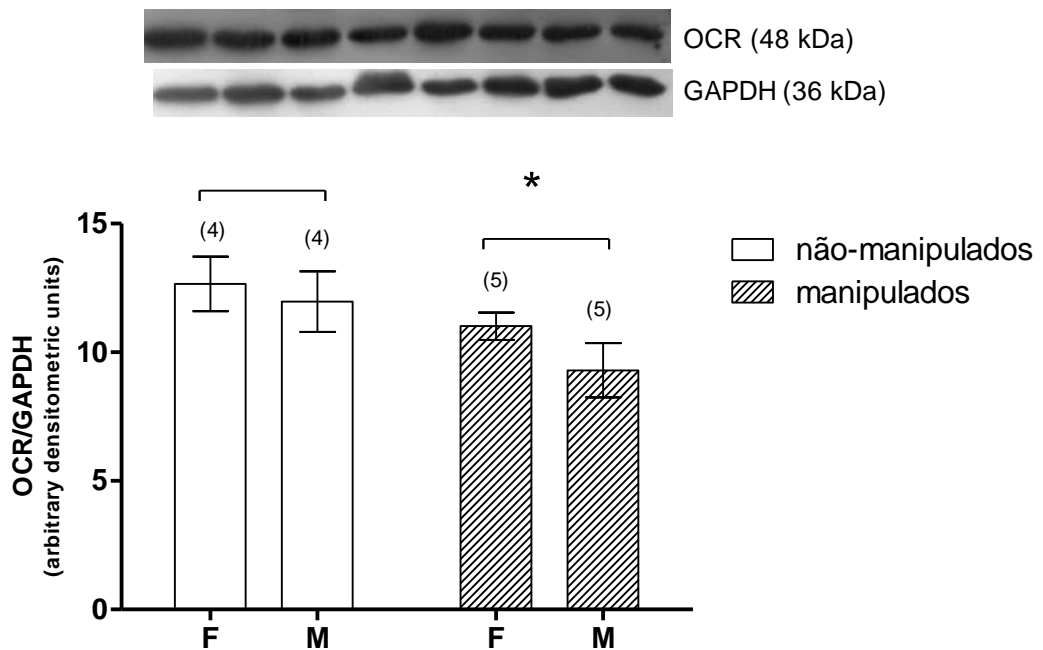


Figura 6. Bulbo Olfatório 30 dias: Concentração de Receptores de Ocitocina em fêmeas (F) e machos (M).



ANOVA de 2 vias seguida por Bonferroni. O *n* está entre parênteses. \*  $P < 0,05$  Não-Manipulado comparado com Manipulado. As bandas representam 2 animais por grupo. F = fêmeas; M = machos

## Discussão

Os resultados apresentados neste capítulo demonstraram que o modelo experimental da manipulação neonatal alterou quantidade dos receptores de ocitocina no bulbo olfatório aos 30<sup>a</sup> dia de idade indicando que o bulbo olfatório é uma estrutura susceptível a intervenções no início do desenvolvimento pós-natal que podem ser detectadas na avaliação da expressão dos receptores de ocitocina. O bulbo olfatório é a estrutura principal no aprendizado olfatório e a alteração que encontramos na expressão dos receptores de ocitocina pode estar relacionada com o resultado de Rainecki et al. (2009) que encontrou que a manipulação repetida no sétimo dia de idade induz em fêmeas uma diminuição no aprendizado olfatório. Este dado relaciona-se ao mecanismo celular para estes efeitos.

A inervação noradrenérgica do bulbo parece crucial para o reconhecimento social. Kendrick (2004) descreveram um modelo celular para o reconhecimento social no rato onde o aumento da atividade da célula mitral no bulbo olfatório dependente da entrada da estimulação noradrenérgica (Liebsch et al. 1998). Consideramos que efeito da manipulação neonatal poderia influenciar este processo no bulbo olfatório repercutindo sobre um prejuízo no reconhecimento social.

A expressão do RNAm de receptor de ocitocina está presente no telencéfalo, mas somente a partir do dia 12 de idade pós-natal em ratos e expressão dos níveis variam consideravelmente (Brinton et al. 2000). Conforme Ostrowski (1998) a expressão do RNA mensageiro de ocitocina no córtex frontal está envolvida com as respostas de reconhecimento social, filiação e comportamentos sociais (Young & Bielsky 2004). O Reconhecimento social é a capacidade de identificar ou reconhecer membros da mesma espécie sendo a base para complexas relações sociais (Choleris et al. 2009; Pierman et al. 2008).

O Olfato desempenha um importante papel no reconhecimento social em roedores (Noack et al. 2010; Wacker et al. 2010), e a ocitocina desempenha um papel neste reconhecimento olfatório (Dluzen et al. 1998; Larrazolo-Lopez et al. 2008; Tobin et al. 2010). A ocitocina atua sobre uma variedade de regiões cerebrais não só facilitar o reconhecimento social, mas também modulam as respostas comportamentais subsequentes (Bielsky & Young 2004; Tobin et al. 2010; Wersinger et al. 2008). A ocitocina modula as regiões olfativas para alterar a memória relacionada ao odor (Dluzen et al. 2000; Tobin et al. 2010).

Choleris et al. (2009) descreve que o reconhecimento social é prejudicado em ratos nocautes para ocitocina, mas apenas em ratos macho nocautes para ocitocina. Os autores propõem que o reconhecimento social depende de um sistema intacto OT em machos e fêmeas, mas que este sistema pode também ser crucialmente sensível ao controlo esteróide gonadal possivelmente através da interação de quatro genes: a OT, OTR, um estrogénio-receptor, e b-estrogénio receptor. Podemos interpretar as alterações que a manipulação neonatal promove na expressão de receptores de ocitocina no córtex frontal possa estar envolvido nos resultados obtidos por Todeschin et al. (2009) que verificou que a manipulação neonatal induziu alterações nos comportamentos sociais reduzindo o tempo de investigação social de ratos machos nos testes de memória social e interação social.

As repercussões dos resultados obtidos estão relacionadas principalmente aos comportamentos sociais que são mediados pela ocitocina tendo em vista, sobretudo que ao bulbo olfatório que é uma estrutura cerebral que está envolvida nas respostas de reconhecimento social por mediar a aprendizagem olfatório (juntamente com o locus coeruleus).



Nossos resultados não verificaram alterações na expressão dos receptores de ocitocina no córtex frontal de ratos machos nos 30<sup>a</sup> dias de idade. Este dado encontra-se destoante com os resultados de outros autores que constataram que as interferências durante o período neonatal induzem alterações da atividade do sistema ocitocinérgico em filhotes (Noonan et al. 1994), em adultos (Francis et al. 2000; Francis et al. 2002).

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

Vias e receptores ocitocinérgicos foram encontrados em regiões cerebrais envolvidas no circuito da ansiedade, o que fundamentou a hipótese de que vias e receptores de ocitocina podem estar relacionados com a modulação da ansiedade (Mantella et al. 2003). Recentemente, investigações da ação da OT sobre respostas relacionadas ao estresse em animais têm sido realizadas. Estímulos estressantes com um componente psicológico, tais como o nado forçado (Wotjak et al. 2001), andar em plataformas (Nishioka et al. 1998) e afastamento social (Neumann et al. 2000b)

induzem a liberação da secreção periférica e central da OT em roedores. Em humanos, investigações ainda são escassas devido à dificuldade de administração da OT.

A administração intranasal de OT em humanos sugere que seus efeitos podem atuar reduzindo o estresse e a ansiedade (Heinrichs et al. 2003). No teste de labirinto em cruz elevado, os animais manipulados permanecem significativamente mais tempo nos braços abertos do que o grupo não manipulado, o que é pode ser um indicativo de menor ansiedade (Severino et al. 2004, Pellow et al. 1985). Além disto, os animais manipulados apresentam aumento da atividade exploratória e atenuação do medo quando expostos a ambientes novos (Padoin et al. 2001; Severino et al. 2004; Madruga et al. 2006).

A manipulação neonatal não alterou expressão dos receptores de ocitocina no córtex pré-frontal de ratos machos aos 11º e 30º dia de idade. Este dado poderia contribuir na compreensão dos resultados dos testes que avaliam ansiedade experimental por interferir nas respostas e na interpretação aos estímulos novos. Alterações da expressão dos receptores de ocitocina em ratos machos e fêmeas poderiam estar relacionados com o baixo desempenho em tarefas de aprendizado verificado em ratos manipulados (Anisman et al.1998) e a interpretação inadequada do ambiente como o comportamento de exploração da área do gato no teste de campo-aberto com gato (Padoin et al. 2001).

Na quantificação por western blot dos receptores de ocitocina nas estruturas cerebrais avaliadas verificamos que o peso molecular que foi detectado foi de 65 KDz sendo que o esperado era o peso molecular de 45 Kdz. Atribuímos esta diferença de peso molecular ao fenômeno da glicosilação da isoforma. A manipulação neonatal promoveu um aumento da expressão dos receptores de ocitocina no córtex frontal de ratos machos nos 30<sup>a</sup> dia de idade. Podemos entender esta alteração como uma resposta

do sistema ocitocinérgico de captar ocitocina de maneira mais eficiente ou de uma exaustão deste mesmo sistema que estaria sendo solicitado mais do que poderia responder. Assim, o aumento do número de receptores para OT no bulbo olfatório pode indicar uma redução da síntese do peptídeo. Esse dado não foi analisado no presente estudo inviabilizando uma conclusão mais definitiva.

Em ratos de 30 dias de idade, a manipulação neonatal induz uma menor expressão de receptores de OT no Bulbo olfatório quando comparados com ratos não manipulados. Tal resultado apresentado nesta tese parece ser fundamental para compreendermos a diminuição do comportamento sociais exibidos pelos animais manipulados já que as interações filhote-mãe requerem circuitos de aproximação social e de motivação intactos. Os sistemas ocitocinérgico e opióide estão envolvidos na motivação do filhote em procurar contato social com sua mãe (Young 1999; Moles et al. 2004).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## DISCUSSÃO GERAL

Existem diversos estudos que verificaram que interferências durante o período neonatal nas interações sociais do animal induzem alterações da atividade do sistema ocitocinérgico em filhotes (Noonan et al. 1994), em adultos (Francis et al. 2000) e vasopressinérgico (Veneema et al. 2012), sendo assim, estas alterações por sua vez podem ter como conseqüências as mudanças comportamentais observadas durante a vida adulta. Mesmo uma breve separação da mãe durante este período, que é estressante para o filhote, pois ocorre interrupção da ligação mãe-filhote (Noonan et al. 1994).

Os nossos resultados demonstram que o procedimento da manipulação neonatal diminuiu de forma constante a interação social já numa idade precoce. No dia pós-natal 25°, 30° e 35° os comportamentos de brincadeira de machos e fêmeas foram reduzidos quando comparados com os animais não manipulados. Os resultados estão de acordo com estudo anterior (Rainecki et al. 2009) mostrando uma preferência diminuição dos filhotes ao odor do ninho original no 7° dia de idade.

Embora a função real da brincadeira no desenvolvimento social permaneça pouco esclarecida, animais privados da oportunidade de brincar durante o período juvenil exibem uma atividade de acasalamento alterado ou reduzido (Gerall et al. 1967; Hard & Larsson 1968; Gruendel & Arnold 1969), redução das interações filiação na idade adulta (Stewart et al. 1979) e aumento de comportamentos agonísticos (Lore & Flannelly 1977). Estudos anteriores (Zanato et al. 1994; Gomes et al. 1999) mostraram uma redução no comportamento sexual em ratos machos e fêmeas manipulados no período neonatal. Estes resultados evidenciam a complexidade de uma intervenção primeiros anos de vida ambiental.

A intervenção ambiental no período neonatal em um animal em desenvolvimento pode afetar vários sistemas neuroendócrinos que repercutem vários sistemas que podem ser suscetíveis a essa intervenção. Este estudo contribui para a compreensão das consequências em curto prazo da manipulação neonatal, o que parece ser crucial para entender as demais alterações promovidas por esta intervenção na idade adulta.

Estudo anterior realizado em nosso laboratório (Severino et al. 2004) demonstrou que a manipulação neonatal reduz a resposta ao estresse em ratos adultos. É interessante notar que os efeitos do procedimento da manipulação neonatal sobre as interações sociais parecem ser estáveis durante toda a vida. É tentador concluir que os efeitos de longa duração do procedimento da manipulação neonatal estariam relacionados com as alterações na relação mãe-filhote. Tem sido proposto que a mãe-bebê relação é a base para futuros comportamentos sociais (Huppertz-Kessler et al. 2012).

Conforme estudo de Parent et al. (2012) o cuidado maternal pode repercutir nos comportamentos sociais de “brincadeira de luta”. Mães ratas que apresentam cuidado maternal alto (“mãe mais lambedoras”) são relacionadas a filhotes que brincam menos quando comparados a filhotes de “mães pouco lambedoras”. Interessante destacar que as mães manipuladas apresentam cuidado maternal semelhante às “mães muito lambedoras”.

Existem estudos demonstrando um comportamento crescente de lambe imediatamente após a manipulação neonatal das mães nos filhotes (Reis et al. 2011). Portanto, assim como no trabalho de Meaney & Parent (2008) nossos resultados demonstram que este tipo de cuidado maternal induz uma diminuição de comportamentos sociais (brincadeira e agregação social).

Essas mudanças no comportamento materno podem ser a base para a sociabilidade posterior da prole assim como se relacionar com o déficit do comportamento de agregação social que os animais manipulados apresentam. A percepção do contexto do ninho pelo neonato manipulado é diferente do ambiente do ninho no filhote que não foi manipulado.

O procedimento de tratamento neonatal reduz a ansiedade e respostas ao stress, que poderiam ser interpretadas como efeitos positivos, por outro lado este procedimento também reduz o comportamento social e reprodutibilidade, o que é um resultado não adaptativo evolutivamente. Seria interessante compreender se estas mudanças estão relacionadas, ou são efeitos paralelos. É possível inferir que o procedimento de manipulação neonatal afeta os sistemas de forma independente ou haveria uma interação cruzada entre eles. A intervenção é a mesma, mas os sistemas seriam afetados separadamente.

Conforme Todeschin et al. (2009) em seu estudo sobre os efeitos da manipulação neonatal sobre a liberação da OT em filhotes e em adultos, e sobre a OT no SNC foi possível perceber que o sistema ocitocinérgico parece ser sensível a interferências ambientais nos primeiros dias de vida. Em filhotes, a manipulação neonatal serviu como estímulo para aumentar a liberação plasmática da OT, comparada a filhotes não-manipulados. Este resultado está de acordo com as evidências encontradas em nosso estudo sobre receptores de ocitocina no bulo olfatório nos 30 dia de idade.

Nosso trabalho demonstrou que alteração em comportamentos sociais que dependem do reconhecimento social para se estabelecerem adequadamente. A ocitocina modula o reconhecimento social e tem um papel à longo prazo no armazenamento de memória de odores envolvidos com reconhecimento sociais em roedores (Wersinger et

al. 2008). Verificamos justamente um aumento da quantidade de receptores de ocitocina no bulbo olfatório (30º dia de idade) o que pode justificar a diminuição dos comportamentos de brincadeira (25º, 30º e 35º dia de idade) e agregação social (7º e 11º dia de idade) que verificamos neste estudo.

Enfim, concluímos que a manipulação neonatal é uma intervenção que pode ser considerada branda, porém, apresenta repercussão prevalente por toda a vida do animal que podem ser avaliadas por parâmetros comportamentais, neuroendócrinos e bioquímicos.



## CONCLUSÕES

Através dos experimentos desenvolvidos, foi possível concluir nesta tese que:

1. A manipulação neonatal é uma intervenção que reduz os comportamentos de brincadeira no 25º, 30º e 35º dias de idade.
2. A manipulação neonatal é uma intervenção que reduz os comportamentos de agregação social no 7º e 11º dias de idade.
3. A manipulação neonatal é um modelo experimental que aumenta a locomoção de filhotes de ratos no 11º dia de idade.
4. A manipulação neonatal, desde cedo reduz as interações sociais dos animais que foram submetidos a esta intervenção.
5. A manipulação neonatal é um modelo experimental que reduz a expressão de receptores de ocitocina no bulbo olfatório no 30º dia de idade.

ANEXO I

**COLONIA:** \_\_\_\_\_ **A- ataque** **R- rolar** **M- montar**  
**Data do parto:** \_\_\_\_\_ **B- Boxing** **PER- perseguit.**  
**Grupo:** \_\_\_\_\_ **P- Pulgar**  
**Ninho:** \_\_\_\_\_ **CH- cheirar**  
**DATA:** \_\_\_\_\_ **DIAS PP:** \_\_\_\_\_

0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1.00	1.03	1.06	1.09	1.12	
CLARO 1																									
0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1.00	1.03	1.06	1.09	1.12	
CLARO 2																									
0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1.00	1.03	1.06	1.09	1.12	
CLARO 3																									
0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1.00	1.03	1.06	1.09	1.12	
ESCURO 1																									

**DATA:** \_\_\_\_\_ **DIAS PP:** \_\_\_\_\_

0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1.00	1.03	1.06	1.09	1.12	
CLARO 1																									
0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1.00	1.03	1.06	1.09	1.12	
CLARO 2																									
0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1.00	1.03	1.06	1.09	1.12	
CLARO 3																									
0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1.00	1.03	1.06	1.09	1.12	
ESCURO 1																									

A
R
B
P
CH
M
PER

A
R
B
P
CH
M
PER

## Mild environmental intervention in mother-infant interactions reduces social play behavior in rats

Ana Raquel M. Karkow and Aldo B. Lucion

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

### Abstract

During early life, animals are sensitive to environmental events that may lead to short-term and long-lasting changes in their neurobiology and behavior, which could be related to increased risk for psychopathology. Neonatal handling is an experimental intervention in the mother-infant relationship. Based on previous studies, it is known to decrease rat pups' preference for maternal cues. Handling also reduces social, sexual, and fear behavior in adult animals, which is related to underlying neuroendocrine alterations. One prominent feature of adolescence is the high frequency of social behaviors such as play that appear to be necessary for proper socioemotional development. The objective of the present study was to investigate the effect of repeatedly handling pups on social play behavior during the neonatal period in juvenile Wistar rats. We found that handling consistently decreased pouncing, wrestling, and chasing play behavior on postnatal days (PND) 25, 30, and 35 compared with non-handled juveniles. As expected, sex differences were also found. Consistent with previous studies in infant and adult rats, the neonatal handling procedure also reduced affiliative behaviors in juvenile animals. The precise mechanisms by which this early intervention leads to these alterations in offspring remain to be determined, but the cumulative effects of briefly disrupting the mother-infant relationship that caused the neonatal handling may be one possible explanation.

**Keywords:** early life intervention, neonatal handling, play behavior, social interaction, juvenile rats.

Received 13 November 2012; received in revised form 1 March 2013; accepted 9 April 2013. Available online 27 June 2013.

### Introduction

Environmental events during early life may induce long-lasting effects on the phenotypes of animals, program the outcome of several behavioral and neuroendocrine features, and increase the vulnerability to pathology (McGowan & Szyf, 2010; Claesens, Daskalakis, van der Veen, Oitzl, de Kloet, & Champagne, 2011; Miller, Chen, & Parker, 2011). Several experimental approaches have been used to study the long-lasting effects of early life events (Tarantino, Sullivan, & Meltzer-Brody, 2011; Roele-Sutherland & Tang, 2011; Zimmerberg & Sageser, 2011; Hippertz-Kessler, Poeschl, Hertel, Unsicker, & Schenkel, 2012). The primary intervention is the

separation of pups from their mother. Many mammals, including humans, need to be cared for, nurtured, and protected after birth; otherwise they die. Thus, the role of the mother is crucial for survival. Neonatal handling is considered a mild environmental intervention that involves briefly removing pups from their mother and does not involve pain or fasting (Noschang, Krolow, Arcego, Toniazio, Huffel, & Dalman, 2012; Veensema, 2012). As a consequence, maternal behavior increases during the period immediately after the pups are returned to the nest (Todeschin et al., 2009). Therefore, part of the effects of the handling procedure appear to be mediated by changes in maternal behavior (Smootherman, Bell, Sturzeo, Elias, & Zachman, 1974; Villescas, Bell, Wright, & Kufner, 1977). Thus, the handling intervention *per se* or the consequent changes in maternal behavior may exert complex effects on the psychosocial development of the animal.

Previous studies from our laboratory have shown that the handling procedure reduces the pups' preference for maternal cues (Raimeli et al., 2009). Later in life, neonatal handling reduces "amicable" social behaviors (Todeschin et al., 2009). Indeed, handling has a major impact on social behaviors in adulthood such as a reduction of sexual behavior (Padoin, Cadore, Gomes, Barros, & Lucion, 2001). However, other effects of environmental intervention during early life appear to depend on time. For example, attenuation of the

Ana Raquel Menezes Karkow and Aldo Bolten Lucion, 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. Ana Raquel Menezes Karkow and Aldo Bolten Lucion, PPG Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, CEP 90050-900, Brazil. Aldo Bolten Lucion, PPG Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, CEP 90050-170, Brazil. Correspondence regarding this article should be directed to: Aldo Bolten Lucion, Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Phone: +55 51-3308-3359. Fax: +55 51-3308-3656. E-mail: alucion@ufrgs.br or aldo.lucion@gmail.com

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ader, R. (1968) Effects of early experiences on emotional and physiological reactivity in the rat. *Journal of Comparative Physiology Psychology* (2):264-8.
- Ader, R. (1969). "Early experiences accelerate maturation of the 24-hour adrenocortical rhythm." *Science* 163(3872): 1225-1226.
- Aguilar, R., Carames, J. M. & Espinet, A.. (2009) Effects of neonatal handling on playfulness by means of reversal of the desire to play in rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 123(4), 347-356.
- Alberts, J.R. (2007) Huddling by rat pups: ontogeny of individual and group behavior. *Dev Psychobiol.* 49(1): 22-32.
- Alberts, J. R. (1978). "Huddling by rat pups: group behavioral mechanisms of temperature regulation and energy conservation." *J Comp Physiol Psychol* 92(2): 231-245.
- Alberts, J. R. (1978). "Huddling by rat pups: multisensory control of contact behavior." *J Comp Physiol Psychol* 92(2): 220-230.
- Alberts, J. R. and P. C. Brunjes (1978). "Ontogeny of thermal and olfactory determinants of huddling in the rat." *J Comp Physiol Psychol* 92(5): 897-906.
- Alberts, J. R. and B. G. Galef, Jr. (1973). "Olfactory cues and movement: stimuli mediating intraspecific aggression in the wild Norway rat." *J Comp Physiol Psychol* 85(2): 233-242.
- Alves SE., Lopez V, Mcewen BS., Weiland NG. (1998) Differential colocalization of estrogen receptor b (ERb) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraoptic nuclei of the female rat brain: An immunocytochemical study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3281–3286.
- Amico, J. A., R. R. Vollmer, et al. (2004). "Centrally administered oxytocin elicits exaggerated grooming in oxytocin null mice." *Pharmacol Biochem Behav* 78(2): 333-339.
- Amico J.A., Mantella R.C., Vollmer R.R., LI. (2004) Anxiety and stress responses in female oxytocin deficient mice. *Journal of Neuroendocrinology* 16:319-324.
- Anda, R.F., Felitti, V.J., Bremner, J.D., Walker, J.D., Whitfield, C., Perry, B.D., Dube Sh., R., Giles, W.H. (2006) The enduring effects of abuse and related adverse experiences in childhood: a convergence of evidence from neurobiology and epidemiology. *Eur. Arch. Psych. Clin. Neurosc.*, 256: 174-186.
- Anderson, T. R. and S. M. Schanberg (1972). "Ornithine decarboxylase activity in developing rat brain." *J Neurochem* 19(6): 1471-1481.
- Anisman, H., Zaharia, M.D., Meaney, M.J. & Merali, Z. (1998) Do early life permanently alter behavioral and behavioral and hormonal responses to stressors? *Int. J. Dev. Neurosci.* 16: 149-164.
- Arborelius, L. and M. B. Eklund (2007). "Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats." *Neuroscience* 145(2): 738-750.
- Bale, TL., Davis AM, Auger AP, Dorsa DM, Mccarthy MM. (2001) CNS Region-Specific Oxytocin Receptor Expression: Importance in Regulation of Anxiety and Sex Behavior. *The Journal of Neuroscience* 21(7):2546–2552.
- Barberis C & Tribollet E. (1996) Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. *Critical Reviews in Neurobiology* 10 119–154.
- Bekoff, M., & Byers, J. A. (Orgs.). *Play: Evolutionary, comparative and ecological perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press. 1998.

Ben-Barak y, James F, Russell T., Whitnall M.H., Ozato k, Gainer H. (1985) Neurophysin in the hypothalamic-neurohypophysial system I. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies. *The Journal of Neuroscience* 5: 81-97.

Bielsky I.F., Young L.J. (2004) Oxytocin, vasopressin and social recognition in mammals. *Peptides* 25(9): 156-174.

Bilbo, S. D., N. J. Newsom, et al. (2007). "Differential effects of neonatal handling on early life infection-induced alterations in cognition in adulthood." *Brain behavior, and immunity* 21(3): 332-342.

Blanchard, D. C. and R. J. Blanchard (1988). "Ethoexperimental approaches to the biology of emotion." *Annual Review of Psychology* 39(1): 43-68.

Birnbaumer M, Seibold A, Gilbert S, Ishido M, Barberis C, Antaramian A, Brabet P & Rosenthal W. (1992) Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature* 357: 333–335.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.

Branchi, I., D. Santucci, et al. (2001). "Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development." *Behav Brain Res* 125(1-2): 49-56.

Brinton RD, Thompson RH, Brownson EA. (2000) Spatial, cellular and temporal basis of vasopressin potentiation of norepinephrine-induced cAMP formation. *Eur J Pharmacol.* Sep 29;405 (1-3):73-88.

Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1998) Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), 5335-5340.

Caldji, c.; Diorio, j. & Meaney, MJ. (2000) Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biological Psychiatry* 48 (12):1164-74.

Caldwell, J. D. (1992). "Central oxytocin and female sexual behavior." *Ann N Y Acad Sci* 652: 166-179.

Caldwell, J. D., G. A. Mason, et al. (1992). "Analysis of oxytocin release by microdialysis and interactions with progesterone." *Ann N Y Acad Sci* 652: 437-439.

Caligioni CS, Oliver C, Jamur MC, Franci CR. (2007) Presence of oxytocin receptors in the gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurones in female rats: a possible direct action of oxytocin on GnRH neurones. *J Neuroendocrinol.* 19(6):439-448.

Carnazzi E, Aumelas A, Barberis C, Guillon G & Seyer R. (1994) A new series of photoactivatable and iodinated linear vasopressin antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* 37 1841–1849.

Carnazzi E, Aumelas A, Phalipou S, Mouillac B, Guillon G, Barberis C & Seyer R. (1997) Efficient photoaffinity labeling of the rat V1A vasopressin receptor using a linear azidopeptidic antagonist. *European Journal of Biochemistry* 247 906–913.

Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., & Meaney, M. J. (2003) Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology & Behavior*, 79(3), 359-371.

Champagne, F. A., Weaver, I. C. G., Diorio, J., Sharma, S., Meaney, M. J. (2003) Natural Variations in Maternal Care Are Associated with Estrogen Receptor  $\alpha$  Expression and Estrogen Sensitivity in the Medial Preoptic Area. *Endocrinol.*, 144: 4720-4724.

Chini B, Mouillac B, Ala Y, Balestre MN, Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Elands J, Hibert M, Manning M, Jard S & Barberis C. (1995) Tyr 115 is the key residue for determining agonist selectivity in the V1a vasopressin receptor. *EMBO Journal* 14 2176–2182.

Chini B, Mouillac B, Balestre MN, Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Hibert M, Andriolo M, Pupier S, Jard S & Barberis C (1996) Two aromatic residues regulate the response of the human oxytocin receptor to the partial agonist arginine vasopressin. *FEBS Letters* 201–206.

Choleris E, Clipperton-Allen AE, Phan A, Kavaliers M. (2009) Neuroendocrinology of social information processing in rats and mice. *Front Neuroendocrinol.* 30(4):442-59.

Choy VJ, Watkins WB. Maturation of the hypothalamo-neurohypophysial system. (1979) I. Localization of neurophysin, oxytocin and vasopressin in the hypothalamus and neural lobe of the developing rat brain. *Cell Tissue Res.* 197(2):325-36.

Claessens, S. E., Daskalakis, N. P., van der Veen, R., Oitzl, M. S., de Kloet, E. R., & Champagne, D. L. (2011) Development of individual differences in stress responsiveness: an overview of factors mediating the outcome of early life experiences. *Psychopharmacology (Berl)*, 214(1), 141-154.

Cirulli, F., L. T. Bonsignore, et al. (2003). "Long-term effects of acute perinatal asphyxia on rat maternal behavior." *Neurotoxicol Teratol* 25(5): 571-578.

Costela, C., P. Tejedor-Real, et al. (1995). "Effect of neonatal handling on learned helplessness model of depression." *Physiol Behav* 57(2): 407-410.

Consiglio AR, Borsoi A, Pereira GA, Lucion AB. (2005) Effects of oxytocin microinjected into the central amygdaloid nucleus and bed nucleus of stria terminalis on maternal aggressive behavior in rats. *Physiol Behav.* 85(3):354-62.

Consiglio, A.R. (2006) Depression Under the Perspective of Oxytocin. *C.N.S. Agents in Med. Chem.*, 6: 293-310.

Dahlström, A.; Fuxe, K. (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand.* 62 (Suppl.) 232:1-55.

De Azevedo, M. S., de Souza, F. L., Donadio, M. V. F., Lucion, A. B., & Giovenardi, M. (2010) Interventions in the neonatal environment in rats and their relationship to behavior in adulthood and maternal behavior. *Psychology & Neuroscience*, 3(1), 73-78.

De Kloet, E. R., E. Vreugdenhil, et al. (1998). "Brain corticosteroid receptor balance in health and disease." *Endocr Rev* 19(3): 269-301.

Dent G. W, Smith M. A, Levine S. (2001) Stress-induced alterations in locus coeruleus gene expression during ontogeny. *Brain Res Dev Brain Res.* 127(1):23-30.

Dluzen DE, Muraoka S, Engelmann M, Landgraf R. (1998) The effects of infusion of arginine vasopressin, oxytocin, or their antagonists into the olfactory bulb upon social recognition responses in male rats. *Peptides* 19(6):999-1005.

Dluzen DE, Muraoka S, Engelmann M, Ebner K, Landgraf R. (2000) Oxytocin induces preservation of social recognition in male rats by activating alpha-adrenoceptors of the olfactory bulb. *Eur J Neurosci.* 12(2):760-766.

Dohlman H, Thorner J, Caron M & Lefkowitz R. (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annual Review of Biochemistry* 60 653–688.

Eilam D, Golani I. (1988) The ontogeny of exploratory behavior in the house rat (*Rattus rattus*): The mobility gradient. *Developmental Psychobiology* 21:679–710.

- Engelmann, M., C. T. Wotjak, et al. (2000). "Behavioural impact of intraseptally released vasopressin and oxytocin in rats." *Exp Physiol* 85 125S-130S.
- Einon, D. F.; Morgan, M. J.; Kibbler, C. C., (1978) Brief periods of socialization and later behavior in the rat. *Dev. Psychobiol.* 11:213- 225.
- Fagen, R. M. (1977) Selection for optimal age-dependent schedules of play behavior. *American Naturalist*, 111, 395-414.
- Fagen, R. M. *Animal Play Behavior*. Nova York: Oxford University Press, 1981.
- Fenoglio, K. A., K. L. Brunson, et al. (2006). "Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: functional and molecular aspects." *Frontiers in neuroendocrinology* 27(2): 180-192.
- Ferguson, J. N., L. J. Young, et al. (2002). "The Neuroendocrine Basis of Social Recognition." *Frontiers in Neuroendocrinology* 23(2): 200-224.
- Francis, D.D.; Caldji, C.; Champagne, F.; Plotsky, P.M.; Meaney, M. J. (1999) The role of corticotrophin-releasing factor-norepinephrine system in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress. *Biol. Psych.*, 46:1153-1166.
- Francis DD, Champagne FC, Meaney MJ. (2000) Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *J Neuroendocrinol.* 12(12):1145-1148.
- Francis DD, Young LJ, Meaney MJ, Insel TR. (2002) Naturally occurring differences in maternal care are associated with the expression of oxytocin and vasopressin (V1a) receptors: gender differences. *J Neuroendocrinol.* 14(5):349-353.
- Franklin, T. B., Linder, N., Russig, H., Thöny, B., & Mansuy, I. M. (2011) Influence of early stress on social abilities and serotonergic functions across generations in mice. *PLoS One*, 6(7), 1-7.
- Freidinger RM & Pettibone DJ. (1997) Small molecule ligands for oxytocin and vasopressin receptors. *Medicinal Research Reviews* 17 1–16.
- Gerall, H. D., Ward, I. L., Gerall, A. A. (1967) Disruption of the male rat's sexual behaviour induced by social isolation. *Animal Behaviour*, 15(1), 54-58.
- Gibb, R. and B. Kolb (2005). "Neonatal handling alters brain organization but does not influence recovery from perinatal cortical injury." *Behav Neurosci* 119(5): 1375-1383.
- Gimpl G, Fahrenholz F. (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev.* 81(2):629-683.
- Gleason, G., Zupan, B., Toth, M. (2011) Maternal genetic mutations as gestational and early life influences in producing psychiatric disease-like phenotypes in mice. *Frontiers in Psychiatry*, 2, 1-10.
- Gomes, C. M., Frantz, P. J., Sanvitto, G. L., Anselmo-Franci, J. A., & Lucion, A. B. (1999) Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32(10), 1239-1242.
- Gomes, C. M., Rainecki, C., Paula, P. R. De, Severino, G. S., Helena, C., Anselmo-Franci, J. A., Franci, C. R., Sanvitto, G. L., Lucion, A. B. (2005) Neonatal handling and reproductive function in female rats. *Journal of Endocrinology* 184:435 - 445.
- Gordon, N. S., Kollack-Walker, S., Akil, H., Panksepp, J. (2002) Expression of c-fos gene activation during rough and tumble play in juvenile rats. *Brain Research Bulletin*, 57(5), 651–659.
- Grazzini E, Lodboerer AM, Perez-Martin A, Joubert D & Guillon G. (1996) Molecular and functional characterization of V1b vasopressin receptor in rat adrenal medulla. *Endocrinology* 137 3906–3914.

Gruendel, A. D., & Arnold, W. J. (1969) Effects of early social deprivation on reproductive behavior of male rats. *Journal of Comparative & Physiological Psychology*, 67(1), 123-128.

Hard, E., & Larsson, K. (1968) Effects of mounts without intromission upon sexual behaviour in male rats. *Animal Behaviour*, 16(4), 538-540.

Hausmann H, Richters A, Kreienkamp H, Meyerhof W, Mattei H, Lederis K, Zwiers H & Richter D. (1996) Mutational analysis and molecular modeling of the nonapeptide hormone binding domains of the [Arg8] vasotocin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93 6907–6912.

Heinrichs, M., T. Baumgartner. (2003) "Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress." *Biol Psychiatry* 54(12): 1389-1398.

Hellstrom, I. C., Dhir, S. K., Diorio, J. C. & Meaney, M. J. (2012) Maternal licking regulates hippocampal glucocorticoid receptor transcription through a thyroid hormone–serotonin–NGFI-A signalling cascade. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367, 2495-510.

Hermel, E. E. S., Severino, G., Ceconello, Al, Pereira, F., Sanvitto, G., Lucion, A. B. (2001) Neonatal handling and the expression of immunoreactivity to tyrosine hydroxylase in the hypothalamus of adult male rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34:1191 - 1195.

Hol T, Van den Berg CL, Van Ree JM, Spruijt BM. (1999) Isolation during the play period in infancy decreases adult social interactions in rats. *Behav Brain Res*. 100(1-2):91-97.

Hole, G. (1991) The effects of social deprivation on levels of social play in the laboratory rat (*Rattus norvegicus*). *Behavioral Processes*, 25, 41-53.

Homberg, J. R., J. D. Olivier, et al. (2007). "Characterization of the serotonin transporter knockout rat: a selective change in the functioning of the serotonergic system." *Neuroscience* 146(4): 1662-1676.

Homberg, J. R., O. J. Schiepers, et al. (2007). "Acute and constitutive increases in central serotonin levels reduce social play behaviour in peri-adolescent rats." *Psychopharmacology (Berl)* 195(2): 175-182.

Hole, G., & Einon, D. F. Play in rodents. In P. K. Smith, (Org.), *Play in Animals and Humans* (pp. 95-117). Oxford: Basil Blackwell; 1984.

Hole, G., (1991) Proximity measures of social play in the laboratory rat. *Dev. Psychobiol.* 24:117-133.

Hotchkiss, A. K., Ostby, J. S., Vandenberg, J. G., & Gray, L. E., Jr. (2003) An environmental antiandrogen, vinclozolin, alters the organization of play behavior. *Physiology & Behavior*, 79(2), 151-156.

Howl J & Wheatley M. (1996) Molecular recognition of peptide and non-peptide ligands by the extracellular domains of neurohypophysial hormone receptors. *Biochemical Journal* 317: 577–582.

Huppertz-Kessler, C. J., Poeschl, J., Hertel, R., Unsicker, K., & Schenkel, J. (2012) Effects of a new postnatal stress model on monoaminergic neurotransmitters in rat brains. *Brain & Development*, 34(4), 274-279.

Jaffee, S.R., Price, T.S. (2012). The implications of genotype–environment correlation for establishing causal processes in psychopathology. *Develop. Psychopathol.*, 24: 1253–1264.

Janus, K. (1987) Early separations of young rats from the mother and the development of play fighting. *Physiology & Behavior*, 39, 471-476.



Kaufman J, Plotsky PM, Nemeroff CB, Charney DS. (2000) Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. *Biol Psychiatry*. 48 (8):778-90.

Kendrick, K. M. (2004). "The neurobiology of social bonds." *Journal of Neuroendocrinology* 16(12): 1007-1008.

Kikusui T, Isaka Y, Mori Y. (2005) Early weaning deprives mouse pups of maternal care and decreases their maternal behavior in adulthood. *Behav Brain Res*. 162(2):200-206.

Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. (2004) Early weaning induces anxiety and aggression in adult mice. *Physiol Behav*. 81(1):37-42.

Kimura T, Makino Y, Saji F, Takemura M, Inoue T, Kikuchi T, Kubota Y, Azuma C, Nobunaga T, Tokugawa Y & Tanizawa O. (1994) Molecular characterization of a cloned human oxytocin receptor. *European Journal of Endocrinology* **131** 385–390.

Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein M & Okayama H. (1992) Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 356 526–529.

Kojima S, Alberts JR. (2011) Oxytocin mediates the acquisition of filial, odor-guided huddling for maternally-associated odor in preweanling rats. *Horm Behav*. 60(5):549-558.

Kojro E, Eich P, Gimpl G & Fahrenholz F. (1993) Direct identification of an extracellular agonist binding site in the renal V2 vasopressin receptor. *Biochemistry* 32 13537–13544.

Larrazolo-López A, Kendrick KM, Aburto-Arciniega M, Arriaga-Avila V, Morimoto S, Frias M, Guevara-Guzmán R. (2008) Vaginal stimulation enhances social recognition memory in rats via oxytocin release in the olfactory bulb. *Neuroscience* 152(3):585-593.

Lemaire V, Lamarque S, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. (2006) Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry*. 9(9):786-792

Leon M. (1992) Neuroethology of olfactory preference development. *J Neurobiol*. 23(10):1557-73.

Levine S. (1962) Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science*. 135:795-796.

Levine, S. (1967). "Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats." *Science* 156(3772): 258-260.

Levine, S. (2001). "Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat." *Physiology & Behavior* 73(3): 255-260.

Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Landgraf R. (1998) Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res*. 94(2):301-10.

Liu, Caldji, et al. (2000). "Influence of Neonatal Rearing Conditions on Stress-Induced Adrenocorticotropin Responses and Norepinephrine Release in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus." *Journal of Neuroendocrinology* 12(1): 5-12.

Liu J & Wess J. (1996) Different single receptor domains determine the distinct G protein coupling profiles of members of the vasopressin receptor family. *Journal of Biological Chemistry* 271 8772–8778.

Lolait S, O'Carroll A, Mahan L, Felder C, Button D, Young III W, Mezey E & Brownstein M. (1995) Extrahypothalamic expression of the rat V1b vasopressin receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92 6783–6787.

Lorden, J. F.; Rickert, E. J.; Dawson, R.; Pelleymounter, M. A. (1980) Forebrain norepinephrine and the selective processing of information. *Brain Res.* 190:569-573.

Lore, R., & Flannelly, K. (1977) Rat societies. *Scientific American*, 236(5), 106-11, 113-6.

Lucion AB, Pereira FM, Winkelman EC, Sanvitto GL, Anselmo-Franci JA. (2003) Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behav Neurosci.* 117(5):894-903.

Lucion, A.B., Padoin, M.J., Pereira, FM., Mandarin-Lacerda, C.A. & Schneider, F.L. (1999) Estimation of the number of neurons in the medial amygdala and frontal cortex of rats submitted to neonatal simulation. 29 Annual Meeting of the Society for Neuroscience.p. 617.

Lucion, A. B., Pereira, F. M., Winkelman, E. C., Sanvitto, G. L., & Anselmo-Franci, J. A. (2003) Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behavioral Neuroscience*, 117(5), 894-903.

Lukas, M., R. Bredewold, et al. (2011). "Early life stress impairs social recognition due to a blunted response of vasopressin release within the septum of adult male rats." *Psychoneuroendocrinology* 36(6): 843-853.

Madruga, C S, Xavier, L L, Achaval, M, Sanvitto, G L, Lucion, A. B. (2006) Early handling, but not maternal separation, decreases emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine. *Behavioural Brain Research* 166: 241 – 246.

Manning M & Sawyer W. (1993) Design, synthesis and some uses of receptor-specific agonists and antagonists of vasopressin and oxytocin. *Journal of Receptor Research* 13 195–214.

Manning M, Cheng L, Stoev S, Sawyer WH, Tribollet E, Barberis C, Wo NC & Chan WY. Novel potent and selective antagonists and radioiodinated ligands for oxytocin and vasopressin receptors. In *Neurohypophysis: Recent Progress of Vasopressin and Oxytocin Research*, pp 21–38. Eds T Saito, K Kurokawa & S Yoshida. Amsterdam: Elsevier, 1995.

Mantella, R. C., R. R. Vollmer, et al. (2003). "Female oxytocin-deficient mice display enhanced anxiety-related behavior." *Endocrinology* 144(6): 2291-2296.

McCarthy, M. M., C. H. McDonald, et al. (1996). "An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse." *Physiol Behav* 60(5): 1209-1215.

Meaney, M. J., D. H. Aitken, et al. (1988). "Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus." *Science* 239(4841): 766.

Meaney, M. J., D. H. Aitken, et al. (1989). "Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat." *Neuroendocrinology* 50(5): 597-604.

Meaney, M. J. Aiken, D.H., Bhatnagar, S., Sapolsky, R.M. (1991) Postnatal Handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. *Neurobiol. Aging.* 12: 31-38.

Meaney, M. J., & Stewart, J. (1981) Neonatal-androgens influence the social play of prepubescent rats. *Hormones and Behavior*, 15(2): 197-213.

McGowan, P. O., & Szyf, M. (2010) The epigenetics of social adversity in early life: implications for mental health outcomes. *Neurobiology of Disease*, 39(1), 66-72.

Meerlo, P. Horvath, K.M., Nagy, G.M. Bohus, B, Koolhaas, J.M. (1999) The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *Jornal of Neuroendocrinology* 11, 925-933.

Mendre C, Dufour MN, Le Roux S, Seyer R, Guillou L, Calas B & Guillon G (1997) Synthetic rat V1a vasopressin receptor fragments interfere with vasopressin

binding via specific interaction with the receptor. *Journal of Biological Chemistry* 272:21027–21036.

Michell RH, Kirk CJ & Billah MM. (1979) Hormonal stimulation of phosphatidylinositol breakdown with particular reference to the hepatic effects of vasopressin. *Biochemical Society Transactions* 861–865.

Miller, G. E., Chen, E., & Parker, K. J. (2011) Psychological stress in childhood and susceptibility to the chronic diseases of aging: moving toward a model of behavioral and biological mechanisms. *Psychological Bulletin*, 137(6), 959-997.

Moles A, Kieffer BL, D'Amato FR. (2004) Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Science* 304(5679):1983-1986.

Moriceau S, Roth TL, Sullivan RM. (2010) Rodent model of infant attachment learning and stress. *Dev Psychobiol.* 52(7):651-660.

Neumann, I. D., L. Torner, et al. (2000a) "Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats." *Neuroscience* 95(2): 567-575.

Neumann, I. D., A. Wigger (2000b) "Brain oxytocin inhibits basal and stress-induced activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male and female rats: partial action within the paraventricular nucleus." *J Neuroendocrinol* 12(3): 235-243.

Noonan LR, Caldwell JD, Li L, Walker CH, Pedersen CA, Mason GA. (1994) Neonatal stress transiently alters the development of hippocampal oxytocin receptors. *Brain Res Dev Brain Res* 80(1-2):115-20.

Nishioka T, Anselmo-Franci JA, Li P, Callahan MF, Morris M. (1998) Stress increases oxytocin release within the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.* 781(1-2):57-61.

Noack J, Richter K, Laube G, Haghgoo HA, Veh RW, Engelmann M. (2010) Different importance of the volatile and non-volatile fractions of an olfactory signature for individual social recognition in rats versus mice and short-term versus long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 94(4):568-575.

Noschang, C., Krolow, R., Arcego, D.M., Toniazzo, A.P., Huffel, A.P., & Dalmaz, C. (2012) Neonatal handling affects learning, reversal learning and antioxidant enzymes activities in a sex-specific manner in rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 30(4), 285-291.

Numan, M. (1988) "Neural basis of maternal behavior in the rat." *Psychoneuroendocrinology* 13(1-2): 47-62.

Ostrowski NL. (1998) Oxytocin receptor mRNA expression in rat brain: implications for behavioral integration and reproductive success. *Psychoneuroendocrinology* 23(8):989-1004.

Padoin, M.J; Cadore, L.P.;Gomes, C.M.; Barros, H.M.& Lucion A.B. (2001) Long-lasting effects of stimulation on the behavior of rats. *Behavioral Neuroscience* 115:1332-1340.

Palkovits M. (1973) Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res.* 59:449-450.

Panksepp, J., & Beatty, W. W. (1980) Social deprivation and play in rats. *Behavioral and Neural Biology*, 30, 197-206.

Panksepp, J.; Normansell, L.; Cox, J. F.; Siviy, S. M. (1994) Effects of neonatal decortication on the social play of juvenile rats. *Physiol. Behav.* 56:429-443.

Panksepp, J.; Siviy, S. M.; Normansell, L. (1984) The psychobiology of play: theoretical and methodological perspectives. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 8:465-492.

Papaioannou, A., U. Dafni, et al. (2002). "Effects of neonatal handling on basal and stress-induced monoamine levels in the male and female rat brain." *Neuroscience* 114(1): 195-206.

Parent, C. I. & Meaney, M. J. (2008) The influence of natural variations in maternal care on play fighting in the rat. *Developmental Psychobiology*, 50, 767–776.

Parent, C. I., Del Corpo, A., Cameron, N. M. & Meaney, M. J. (2012) Maternal care associates with play dominance rank among adult female rats. *Developmental Psychobiology*, July 11:1-12.

Parker, K. J., C. L. Buckmaster, et al. (2005). "Intranasal oxytocin administration attenuates the ACTH stress response in monkeys." *Psychoneuroendocrinology* 30(9): 924-929.

Patin, V., B. Lordi, et al. (2005) "Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats." *Brain Res Dev Brain Res* 160(2): 265-274.

Pauk, J., C. M. Kuhn, et al. (1986) "Positive effects of tactile versus kinesthetic or vestibular stimulation on neuroendocrine and ODC activity in maternally-deprived rat pups." *Life Sci* 39(22): 2081-2087.

Pedersen CA, Boccia ML. (2002) Oxytocin Maintains as Well as Initiates Female Sexual Behavior: Effects of a Highly Selective Oxytocin Antagonist. *Hormones and Behavior* 41:170–177.

Pedersen CA, Boccia ML. (2006) Vasopressin interactions with oxytocin in the control of female sexual behavior. *Neuroscience* 139(3):843-851.

Pedersen, C.A.; Johns, J.M., Musiol, I; Perez-Delgado, M.; Ayers, G.; Faggin, B.; Caldwell, J.D. (1995) Interfering with somatosensory stimulation from pups sensitizes experienced, postpartum rat mothers to oxytocin antagonist inhibition of maternal behavior. *Behavioral Neuroscience* 109(5): 980-90.

Pellis, S. M.; Pellis, V. C.; Whishaw, I. Q. (1992) The role of the cortex in play fighting by rats: developmental and evolutionary implications. *Brain Behav. Evol.* 39:270--284.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. (1985) Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14: 149-167.

Petersen M B. (2006) The Effect of Vasopressin and Related Compounds at V1a and V2 Receptors in Animal Models Relevant to Human Disease. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 99: 96–103.

Pierman S, Sica M, Allieri F, Viglietti-Panzica C, Panzica GC, Bakker J. (2008) Activational effects of estradiol and dihydrotestosterone on social recognition and the arginine-vasopressin immunoreactive system in male mice lacking a functional aromatase gene. *Horm Behav.* 54(1): 98-106.

Plotsky , P..M, Meaney, M.J (1993) Early postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) RNAm, median eminence CRF content and stress induce release in adult rats. *Molecular Brain Research.* 18:195-200.

Plotsky, P. M. & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Research Molecular Brain Research*, 18, 195-200.

Pryce, C. R., D. Bettschen, et al. (2001) "Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat." *Dev Psychobiol* 38(4): 239-251.

Pryce C.R., Bettschem D., Feldon J. (2004) Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Developmental Psychobiology* 38:239-251.

Purba J.S., Hoogendijk W.J., Hofman M.A., Swaab D.F. (1996) Increased number of vasopressin and oxytocin-expressing neurons in paraventricular nucleus of hypothalamus in depression. *Archives of Gen Psychiat* 56(2): 137-143.

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. (2009) Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. *Neuroscience*, 159, 31-38.

Raineki C, Moriceau S, Sullivan RM. (2010) Developing a neurobehavioral animal model of infant attachment to an abusive caregiver. *Biol Psychiatry*. 67(12):1137-1145.

Reeb-Sutherland, B. C., & Tang, A. C. (2011) Dissociation between neonatal novelty-induced preferential maternal care and enhancement in cognitive, social, and emotional functions. *Behavioural Brain Research*, 224(2), 318-325.

Reis, A. R., De Azevedo, M. S., Alves, M. B., & Lucion, A. B. (2011) Efeito da Manipulação Neonatal sobre o Vínculo Mãe-Filhote. in: VII Congresso Brasileiro de Cérebro Comportamento e Emoções, Gramado-RS. *Revista Eletrônica do CBCCE*.

Reversi, A., V. Rimoldi, et al. (2005). "The oxytocin receptor antagonist atosiban inhibits cell growth via a "biased agonist" mechanism." *J Biol Chem* 280(16): 16311-16318.

Reversi A, Rimoldi V, Brambillasca S, Chini B. (2006) Effects of cholesterol manipulation on the signaling of the human oxytocin receptor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 291(4):R861-869.

Rinaman L. (2007) Visceral sensory inputs to the endocrine hypothalamus. *Frontiers in Neuroendocrinology* 28: 50–60.

Rodrigues AL, Arteni NS, Abel C, Zylbersztejn D, Chazan R, Viola G, Xavier L, Achaval M, Netto CA. (2004) Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res*. 1002(1-2):94-99.

Ruscio MG, Sweeny T., Hazelton J, Suppatkul P, Carter C.S. (2007) Social environment regulates corticotropin releasing factor, corticosterone and vasopressin in juvenile prairie voles. *Hormones and Behavior* 51: 54–61.

Schank JC, Alberts JR. (2000) The developmental emergence of coupled activity as cooperative aggregation in rat pups. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267:2307–2315.

Schank JC (2008) The development of locomotor kinematics in neonatal rats: an agent-based modeling analysis in group and individual contexts. *Journal of Theoretical Biology* 254:826–842.

Severino, G. S., Fossati, I. A., Padoin, M. J., Gomes, C. M., Trevizan, L., Sanvitto, G. L., Franci, C. R., Anselmo-Franci, J. A., & Lucion, A. B. (2004) Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiology & Behavior*, 81, 489-498.

Sinding C, Seif SM, Robinson AG. (1980) Levels of neurohypophyseal peptides in the rat during the first month of life. Basal levels in plasma, pituitary, and hypothalamus. *Endocrinology* 107(3):749-54.

Sinding C, Robinson AG, Seif SM, Schmid PG. (1980) Neurohypophyseal peptides in the developing rat fetus. *Brain Res.* 195(1):177-86.

Silveira, P. P., A. K. Portella, et al. (2005) "The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior." *Int J Dev Neurosci* 23(1): 93-99.

Siviy, S. M. and K. A. Harrison (2008) "Effects of neonatal handling on play behavior and fear towards a predator odor in juvenile rats (*Rattus norvegicus*)." *J Comp Psychol* 122(1): 1-8.

Smotherman, W. P., Bell, R. W., Starzec, J., Elias, J., & Zachman, T. A. (1974) Maternal responses to infant vocalizations and olfactory cues in rats and mice. *Behavioral Biology*, 12(1), 55-66.

Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev.* 24(4):417-463.

Stamatakis, A., A. Mantelas, et al. (2006) "Effect of neonatal handling on serotonin 1A sub-type receptors in the rat hippocampus." *Neuroscience* 140(1): 1-11.

Stewart, J., Vallentyne, S., & Meaney, M. J. (1979) Differential effects of testosterone metabolites in the neonatal period on open-field behavior and lordosis in the rat. *Hormones and Behavior*, 13(3): 282-292.

Stone, A. I., & Bales, K. L. (2010) Intergenerational transmission of the behavioral consequences of early experience in prairie voles. *Behavioural Processes*, 84(3): 732-738.

Tang, A. C. (2001). "Neonatal exposure to novel environment enhances hippocampal-dependent memory function during infancy and adulthood." *Learn Mem* 8(5): 257-264.

Tarantino, L. M., Sullivan, P. F., & Meltzer-Brody, S. (2011) Using animal models to disentangle the role of genetic, epigenetic, and environmental influences on behavioral outcomes associated with maternal anxiety and depression. *Frontiers in Psychiatry* 2: 1-10.

Thor, D. H., & Holloway, W. R., Jr. (1986) Social play soliciting by male and female juvenile rats: effects of neonatal androgenization and sex of cagemates. *Behavioral Neuroscience*, 100(2), 275-279.

Tobin VA, Hashimoto H, Wacker DW, Takayanagi Y, Langnaese K, Caquineau C, Noack J, Landgraf R, Onaka T, Leng G, Meddle SL, Engelmann M, Ludwig M. (2010) An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition. *Nature* 464(7287):413-417.

Todeschin, A. S., Winkelmann-Duarte, E. C., Jacob, M. H. V., Aranda, B. C. C., Jacobs, S., Fernandes, M. C., Ribeiro, M. F. M., Sanvitto, G. L., & Lucion, A. B. (2009) Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Hormones and Behavior* 56: 93-100.

Trezza, V., Baarendse, P. J. J. & Vanderschuren, L. J. M. J. (2010) The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences* 31: 463-469.

Tribollet, E., M. Dubois-Dauphin, et al. (1992) Oxytocin receptors in the central nervous system. Distribution, development, and species differences. *Ann N Y Acad Sci* 652: 29-38.

van den Berg CL, Hol T, Van Ree JM, Spruijt BM, Everts H, Koolhaas JM. (1999) Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. *Dev Psychobiol.* 34(2):129-138.

Varlinskaya EI, Spear LP. (2008) Social interactions in adolescent and adult Sprague-Dawley rats: impact of social deprivation and test context familiarity. *Behav Brain Res.* 188(2):398-405.

Veenema, A. H. (2012) Toward understanding how early-life social experiences alter oxytocin- and vasopressin-regulated social behaviors. *Hormones and Behavior*, 61(3), 304-312.

Veyrac A, Didier A, Colpaert F, Jourdan F, Marien M. (2005) Activation of noradrenergic transmission by alpha2-adrenoceptor antagonists counteracts deafferentation-induced neuronal death and cell proliferation in the adult mouse olfactory bulb. *Exp Neurol*. 194(2):444-456.

Villescas, R., Bell, R. W., Wright, L., & Kufner, M. (1977) Effect of handling on maternal behavior following return of pups to the nest. *Developmental Psychobiology*, 10(4), 323-329.

Wacker DW, Tobin VA, Noack J, Bishop VR, Duszkiwicz AJ, Engelmann M, Meddle SL, Ludwig M. (2010) Expression of early growth response protein 1 in vasopressin neurones of the rat anterior olfactory nucleus following social odour exposure. *J Physiol*. 588(Pt 23):4705-4717.

Wallner B, Dittami J, Machatschke I. (2006) Social stimuli cause changes of plasma oxytocin and behavior in guinea pigs. *Biol Res*. 39(2):251-258.

Ward IL, Stehm KE. (1991) Prenatal stress feminizes juvenile play patterns in male rats. *Physiol Behav*. 50(3):601-605.

Wersinger SR, Temple JL, Caldwell HK, Young WS 3rd. (2008) Inactivation of the oxytocin and the vasopressin (Avp) 1b receptor genes, but not the Avp 1a receptor gene, differentially impairs the Bruce effect in laboratory mice (*Mus musculus*). *Endocrinology* 149(1):116-121.

Wettschureck, N., A. Moers, et al. (2004a) "Mouse models to study G-protein-mediated signaling." *Pharmacol Ther* 101(1): 75-89.

Wettschureck N, Moers A, Hamalainen T, Lemberger T, Schütz G, Offermanns S. (2004b) Heterotrimeric G proteins of the Gq/11 family are crucial for the induction of maternal behavior in mice. *Mol Cell Biol*. 24(18):8048-8054.

Windle RJ, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD. (1997) Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. *Endocrinology* 138(7):2829-2834.

Winkelmann-Duarte, E, Todeschin, A, Fernandes, M, Bittencourt, L, Pereira, G, Samios, V, Schuh, A, Achaval, M, Xavier, L, Sanvitto, G (2007) Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. *Brain Research* 1170:20 - 30.

Winkelmann-Duarte, E.C., Padilha-Hoffmann, C. B., Martins, D. F., Schuh, A. F. S., Fernandes, M. C., Santin, R., Merlo, S., Sanvitto, G. L., Lucion, A. B. (2011) Early-life environmental intervention may increase the number of neurons, astrocytes, and cellular proliferation in the hippocampus of rats. *Experimental Brain Research* 215:163 - 172.

Whitman, B. A., Breuner, C. W., & Dufty, A. M., Jr. (2011) The effects of neonatal handling on adrenocortical responsiveness, morphological development and corticosterone binding globulin in nestling American kestrels (*Falco sparverius*). *General and Comparative Endocrinology*, 172(2), 260-267.

Wotjak CT, Naruo T, Muraoka S, Simchen R, Landgraf R, Engelmann M. (2001) Forced swimming stimulates the expression of vasopressin and oxytocin in magnocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci*. 13(12):2273-81.

Young LJ. (1999) Oxytocin and vasopressin receptors and species-typical social behaviors. *Horm Behav*. 36(3):212-221.

Young LJ, Bielsky IF (2004) Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides* 25(9):1565-1574.

Zanato, V. F., Martins, M. P., Anselmo-Franci, J. A., Petenusci, S. O., & Lamano-Carvalho, T. L. (1994) Sexual development of male Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27(5), 1273-1280.

Zeki, S. (2007). "The neurobiology of love." *FEBS Lett* 581(14): 2575-2579.

Zimmerberg, B. and K. A. Sageser (2011) "Comparison of two rodent models of maternal separation on juvenile social behavior." *Front Psychiatry* 2: 39.

Zingg HH, Laporte SA. (2003) The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab.* 14(5):222-227.

Zhang, Z., Zhang, H., Du, B., & Chen, Z. (2012) Neonatal handling and environmental enrichment increase the expression of GAP-43 in the hippocampus and promote cognitive abilities in prenatally stressed rat offspring. *Neuroscience Letters*, 522(1), 1-5.