UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Substratos neuroanatômicos e celulares do
comportamento de autolimpeza exacerbada (*hypergrooming*)
induzido pela injeção de ocitocina no núcleo central da amígdala,
um modelo experimental de transtorno obsessivo-compulsivo**

Simone Saldanha Marroni

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para concorrer ao Título de Mestre,
pelo curso de Pós-Graduação em Neurologia-
Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco

Ribeirão Preto
2005

“A memória é uma ilha de edição”

Waly Salomão

SUMÁRIO

<u>LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....</u>	<u>V</u>
<u>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</u>	<u>VII</u>
<u>RESUMO.....</u>	<u>VIII</u>
<u>ABSTRACT.....</u>	<u>IX</u>
<u>AGRADECIMENTOS.....</u>	<u>X</u>
<u>1 INTRODUÇÃO.....</u>	<u>1</u>
1.1 LOCALIZAÇÃO E SÍNTESE DA OCITOCINA	1
1.2 FUNÇÃO DA OCITOCINA	2
1.3 NEUROBIOLOGIA DO TRANSTORNO OBSESSIVO-COMPULSIVO (TOC).....	3
1.4 OCITOCINA E TOC	4
1.5 COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> (AUTOLIMPEZA).....	5
<u>2 OBJETIVOS.....</u>	<u>10</u>
<u>3 MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<u>11</u>
3.1 ANIMAIS	11
3.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	11
3.3 INJEÇÃO DO TRAÇADOR NEURONAL RETRÓGRADO	12
3.4 ADMINISTRAÇÃO BILATERAL DE OCITOCINA NO NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA.....	13
3.5 SISTEMA DE OBSERVAÇÃO E REGISTRO	14
3.6 QUANTIFICAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE AUTOLIMPEZA	14

3.7	PERFUSÃO DOS ANIMAIS.....	14
3.8	CORTE DOS CÉREBROS	15
3.9	HISTOLOGIA	15
3.9.1	HISTOQUÍMICA PARA <i>NISSL</i>	15
3.9.2	IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA OCITOCINA	16
3.9.3	<i>BINDING</i> PARA RECEPTORES DE OCITOCINA	16
3.10	VISUALIZAÇÃO, AQUISIÇÃO DE IMAGENS E ANÁLISE DAS HISTOLOGIAS.....	17
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
<u>4</u>	<u>RESULTADOS</u>	<u>20</u>
4.1	AUTOLIMPEZA EXACERBADA PELA OCITOCINA: <i>HYPERGROOMING</i>.....	20
4.2	VERIFICAÇÃO DO SÍTIO DE INJEÇÃO DO <i>FLUORO-GOLD</i>.....	27
4.3	LOCALIZAÇÃO DE NEURÔNIOS AFERENTES DA AMÍGDALA CENTRAL	27
4.4	CO-LOCALIZAÇÃO DE <i>FLUORO-GOLD</i> E IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA OT	29
4.5	CO-LOCALIZAÇÃO DE <i>BINDING</i> E IMUNOFLUORESCÊNCIA	34
4.6	ANIMAIS CONTROLES	37
<u>5</u>	<u>DISCUSSÃO.....</u>	<u>38</u>
<u>6</u>	<u>CONCLUSÕES.....</u>	<u>45</u>
<u>7</u>	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	<u>46</u>

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> ESPONTÂNEO NOS RATOS: 1) LIMPEZA DE GARRAS ANTERIORES, 2) CABEÇA COM PATAS ANTERIORES, NA REGIÃO ENTRE ORELHAS E FOCINHO, 3) CABEÇA COM PATAS ANTERIORES, NA REGIÃO DO FOCINHO, 4) CABEÇA COM PATAS ANTERIORES, NA REGIÃO DAS ORELHAS E 5) CORPO NA REGIÃO VENTRAL, LATERAL E DORSAL	6
FIGURA 2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	19
FIGURA 3 ESQUEMAS DO ATLAS PAXINOS E WATSON (1997) MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DA PONTA DAS CÂNULAS (ASTERISCOS) NO CEA DOS RATOS WISTAR. RATOS R2, R4, R7, R8, R11, R13, R14, R15, R16.....	22
FIGURA 4 POSIÇÃO DAS CÂNULAS QUE NÃO SE ENCONTRAVAM NO CEA DOS RATOS WISTAR. ESQUEMAS DO ATLAS PAXINOS E WATSON (1997) MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DA PONTA DAS CÂNULAS (ASTERISCOS) NOS RATOS R5, R6, R9, R10.	23
FIGURA 5 GROOMING SCORE DE ANIMAIS WISTAR (N = 9) APÓS INJEÇÕES BILATERAIS DE SALINA E OT NO CEA. A, MÉDIA DAS RESPOSTAS $\pm$ EPM. B, DECURSO DO EFEITO DA INJEÇÃO DE SALINA E DE OT NA AMÍGDALA CENTRAL SOBRE O COMPORTAMENTO DE AUTOLIMPEZA * $P < 0.05$	24
FIGURA 6 GROOMING SCORE DE ANIMAIS WISTAR (N=3) APÓS INJEÇÕES BILATERAIS DE SALINA E OT NO CEA. A, MÉDIA DAS RESPOSTAS $\pm$ EPM. B, DECURSO DO EFEITO DA INJEÇÃO DE SALINA E DE OT NA AMÍGDALA CENTRAL SOBRE O COMPORTAMENTO DE AUTOLIMPEZA * $P < 0.05$	25
FIGURA 7 GROOMING SCORE DE ANIMAIS WISTAR (N=12) APÓS INJEÇÕES BILATERAIS DE SALINA E OT NO CEA. A, MÉDIA DAS RESPOSTAS $\pm$ EPM E B, DECURSO DO EFEITO DA INJEÇÃO DE SALINA E DE OT NA AMÍGDALA CENTRAL SOBRE O COMPORTAMENTO DE AUTOLIMPEZA * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$	25
FIGURA 8 GROOMING SCORE DE ANIMAIS WISTAR (N=4) APÓS INJEÇÕES BILATERAIS DE SAINA/SALINA NO CEA. A, MÉDIA DAS RESPOSTAS $\pm$ EPM E B, DECURSO DO EFEITO DA INJEÇÃO DE SALINA E DE OT NA AMÍGDALA CENTRAL SOBRE O COMPORTAMENTO DE AUTOLIMPEZA.....	26
FIGURA 9 FOTOMICROGRAFIAS MOSTRANDO EM (A) A MIGRAÇÃO DO TRAÇADOR NEURONAL PARA O NÚCLEO MEDIAL DA AMÍGDALA E EM (B) O SÍTIO DE MICROINJEÇÃO DO FLUORO-GOLD NO NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA (CEA). BARRA DE ESCALA: 250 MM	27
FIGURA 10 FOTOMICROGRAFIAS MOSTRANDO CÉLULAS COM <i>FLUORO-GOLD</i> . PAINEL ESQUERDO: ESQUEMA DAS SECÇÕES DO ATLAS PAXINOS & WATSON, 1997 RETÂNGULO ACHURADO (A) NÚCLEO PARAVENTRICULAR TALÂMICO (PVA), (B) NÚCLEO PARATENIAL TALÂMICO (PT), (C) NÚCLEO HIPOTALÂMICO PERIVENTRICULAR (PE), (D) NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVH), (E) ÁREA HIPOTALÂMICA	

DORSAL (DHA), (F) ÁREA HIPOTALÂMICA ANTERIOR (AHA), (G) ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL (LHA), (H) NÚCLEO HIPOTALÂMICO VENTROMEDIAL (VMH), (I) ÁREA TEGMENTAL VENTRAL (VTA), (J) SUBSTÂNCIA NEGRA, PARTE RETICULAR (SNpr), (K) NÚCLEO GENICULADO MEDIAL (MG), (L) NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL (LPB), (M) NÚCLEO DORSAL DA RAFE (DR), (N) CAUDADO-PUTAMEN (CPU), (O) NÚCLEO DO LEITO DA ESTRIA TERMINAL (BST) E (P) NÚCLEO MEDIAL DA AMÍGDALA (MeA). BARRA DE ESCALA: 250 μ M.

..... 28

FIGURA 11 FOTOMICROGRAFIAS MOSTRANDO CO-LOCALIZAÇÃO DE OT (VERMELHO) E FLUORO-GOLD (AZUL). EM (A E C) NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVH), (D, 40X) MAIOR AUMENTO DA ÁREA SELECIONADA EM (C) E (B E E) ÁREA HIPOTALÂMICA DORSAL (DHA), (F, 40X) MAIOR AUMENTO DA ÁREA SELECIONADA EM (D), NO RETÂNGULO MARCAÇÃO COM NISSL. BARRA DE ESCALA: 250 μ M..... 30

FIGURA 12 MONTAGEM DE FOTOMICROGRAFIAS MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DE OT. (A) NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVH), ZONA INCERTA (ZI), NÚCLEO SUPRAÓPTICO (SON); (B) ÁREA HIPOTALÂMICA DORSAL (DHA), NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO, PARTE POSTERIOR (PAPO), ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL (LHA) E (C) NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVH), ÁREA HIPOTALÂMICA ANTERIOR, CENTRAL (AHC), NÚCLEO SUPRAÓPTICO (SON). BARRA DE ESCALA: 250 μ M... 32

FIGURA 13 MONTAGEM DE FOTOMICROGRAFIAS MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DE OT NOS NÚCLEOS PVH E SON. BARRA: 1000 μ M. 33

FIGURA 14 Co-LOCALIZAÇÃO DE OT (VERMELHO) E SEU RECEPTOR (VERDE). (A) RECEPTOR PARA OT NO PVH, (B) OT NO PVH, (C) CO-LOCALIZAÇÃO, (D) MAIOR AUMENTO DA ÁREA SELECIONADA EM C, (E) RECEPTOR PARA OT NO SON, (F) OT NO SON E (G) CO-LOCALIZAÇÃO. AS SETAS EM G MOSTRAM DUPLA-MARCAÇÃO. BARRA DE ESCALA: 40 μ M E (D) 60 μ M. 36

TABELA 1 INDICAÇÃO DE PRESENÇA (X) OU AUSÊNCIA (-) DE MARCAÇÃO SIMPLES (FG; OT) OU DUPLA (FG/OT).34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg - micrograma

µL - microlitro

µm - micrômetro

nL - nanolitro

AHC - área hipotalâmica anterior, central

BST - núcleo do leito da estria terminal

CeA - núcleo central da amígdala

COF- córtex órbito frontal

Cpu - caudado putamen

DHA - área hipotalâmica dorsal

DR - núcleo dorsal da rafe

FG - *Fluoro-Gold*

LHA - área hipotalâmica lateral

LPB - núcleo parabraquial lateral

MeA - núcleo medial da amígdala

MG - núcleo geniculado medial

OT - ocitocina

PaPo - núcleo paraventricular do hipotálamo, parte posterior

Pe - núcleo hipotalâmico periventricular

PT - núcleo paratenial talâmico

PVA - núcleo paraventricular talâmico

PVH - núcleo paraventricular do hipotálamo

SNpr- substância negra, parte reticular

SON - núcleo supraóptico

TOC - Transtorno Obsessivo-Compulsivo

VMH - núcleo hipotalâmico ventromedial

VTA - área tegmental ventral

ZI - zona incerta

RESUMO

Ocitocina (OT) é um nonapeptídeo neurosecretório sintetizado nas células hipotalâmicas que se projetam para a neurohipófise e para locais extensamente distribuídos no sistema nervoso central. As microinjeções centrais de OT induzem uma variedade de comportamentos em animais no âmbito cognitivo, sexual, reprodutivo, de autolimpeza e afiliativo. O transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) inclui uma escala dos sintomas cognitivos e comportamentais que tem alguma relação com dimensões de comportamento associadas com a OT. A administração de OT no núcleo central da amígdala (CeA) induz autolimpeza exacerbada, considerada um sintoma de TOC. Neste trabalho, nós estudamos os substratos neuroanatômicos e celulares deste comportamento. Nossos dados sugerem uma ligação entre o CeA e a “área hipotalâmica de *grooming*” (HGA). A HGA inclui parte do núcleo paraventricular do hipotálamo e a área hipotalâmica dorsal. Nossos dados mostrando co-localização de OT (imunohistoquímica para peptídeo), receptor para OT (ensaio de *binding*) e marcação de células retrogradamente depois da injeção de *Fluoro-Gold* no CeA sugerem que o CeA e conexões são substratos importantes nos circuitos subjacentes de comportamento normal e de quadro patológico tal como o TOC dependente de OT descrito neste trabalho.

ABSTRACT

Oxytocin (OT) is a neurosecretory nonapeptide synthesized in hypothalamic cells that project to the neurohypophysis as well as to widely distributed sites in the central nervous system. Central OT microinjections induce a variety of cognitive, sexual, reproductive, grooming and affiliative behaviors in animals. Obsessive-compulsive disorder (OCD) includes a range of cognitive and behavioral symptoms that bear some relationship to dimensions of behavior associated with OT. The administration of OT into central nucleus of amygdala (CeA) induces hypergrooming, considered a symptom of OCD. Here, we study the neuroanatomical and cellular substrates of this behavior. Our data suggest a link between the CeA and the “hypothalamic grooming area” (HGA). The HGA includes parts of the paraventricular hypothalamic nucleus and the dorsal hypothalamic area. Our data on co-localization of OT (immunohistochemistry for peptide), OT receptor (*binding* assay) and retrogradely labeled cells after Fluoro Gold injection in CeA suggest that CeA and connections are an important substrate of the circuit underlying this OCD-like OT-dependent behavior.

AGRADECIMENTOS

Agradeço á todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco que acreditou em mim, obrigada pela orientação e incentivo.

A todos os Profs. da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela contribuição na minha formação.

Aos meus amigos e companheiros do laboratório, Arthur, Érika, Franco, Frederico, Gabriel, Maira, Malú, Marcelo, Olagide, Poliana e Toulouse, e também aos técnicos José Antônio, Flávio e Rubens pelos ensinamentos e amizade.

Ao Christiano e Cristiane pelos ensinamentos no início do meu Mestrado, muito obrigada!

Aos meus amigos da casa dos pós-graduandos (casa 13) pela boa recepção.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Luiz, minha inspiração, e à sua família.

À minha querida mãe Neusa, irmãs Lílian e Aline e a minha sobrinha Lorena, pelo carinho, apoio e companheirismo ao longo desses anos, amo muito vocês.

1 Introdução

1.1 Localização e síntese da ocitocina

A ocitocina (OT) é um peptídeo que contém nove resíduos de aminoácidos. Ela é sintetizada nos corpos celulares dos neurônios nos núcleos supraóptico (SON) e paraventricular do hipotálamo (PVH) e depois levada via transporte axonal à hipófise posterior. Potenciais de ação nessas células neurosecretoras desencadeiam a liberação da OT nos terminais axonais na neurohipófise de onde é liberada para a corrente sanguínea. No PVH, duas populações de neurônios ocitocinérgicos têm sido encontradas: neurônios magnocelulares que terminam na neurohipófise e neurônios parvocelulares que terminam em outras áreas no sistema nervoso central (Gimpl e Fahrenholz, 2001). Além disso, OT sintetizada principalmente por neurônios parvocelulares no PVH pode ser liberada diretamente no líquido por dendritos da parede do terceiro ventrículo (Dogterom e cols.,1977, apud Leckman e cols,1994).

A OT plasmática não atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, e não há relação entre a liberação de OT na corrente sanguínea e a concentração de OT no líquido. Estimulações periféricas como sucção do mamilo ou dilatação vaginal que causam um grande aumento de OT no plasma, não necessariamente mudam as concentrações de OT no líquido. A estimulação elétrica na neurohipófise de ratos somente evoca a liberação de OT na corrente sanguínea, enquanto estimulação do PVH causa a liberação de OT na corrente sanguínea e líquido (Harris e cols, 1981, apud Gimpl e Fahrenholz, 2001). Depois de uma hipofisectomia a OT desaparece do plasma, enquanto sua concentração aumenta no líquido.

Neurônios hipotalâmicos ocitocinérgicos também enviam projeções para muitas regiões prosencefálicas, diencefálicas e no tronco cerebral (Sofroniew, 1983). Além disso, em todos estes locais foram detectados receptores para OT (Gimpl e Fahrenholz 2001).

1.2 Função da ocitocina

Ao mesmo tempo em que o estímulo para a liberação de OT é a distensão do trato reprodutivo e a sucção do mamilo, este hormônio estimula a contração, tanto uterina durante o parto, quanto da musculatura lisa nas glândulas mamárias durante a amamentação (Reeves e Adreoli, 1992).

Além do papel clássico hormonal, a OT age como neurotransmissor ou neuromodulador, podendo desempenhar ou influenciar funções como expressão exagerada do comportamento de *grooming* (autolimpeza; Drago e cols, 1986); maternal (Numan, 1994); sexual (Bale e cols., 2001); agressivo (Devries e cols, 1997); e de alimentação (Arletti e cols., 1989). A OT também está relacionada à ação amnésica (Bohus e cols, 1978); antidepressiva (Arletti e Bertolini, 1987); ansiolítica (Uvnas-Moberg e cols., 1992a, 1994; Bale e cols, 2001) e antinociceptiva (Uvnas-Moberg e cols, 1992b).

A liberação central de OT pode ser independente da liberação desse peptídeo na neurohipófise, assim não há correlação entre a OT liberada no líquido e aquela liberada no plasma em resposta a vários estímulos (Amico e cols., 1990; Kendrick e cols, 1986, apud Leckman e cols, 1994). Por exemplo, a administração sistêmica de apomorfina, um potente mais não específico agonista da dopamina, pode aumentar drasticamente e de maneira dose-dependente os níveis plasmáticos de OT em ratos (Melis e cols, 1990) e primatas (Cameron e cols, 1992). Entretanto, no mesmo experimento em ratos,

a apomorfina sistêmica não teve efeito nas concentrações de OT na área septal e na diminuição da concentração de OT no hipotálamo (Melis e cols, 1990).

1.3 Neurobiologia do Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC)

O TOC é atualmente um dos problemas mais comuns em psiquiatria, com uma prevalência cerca de 3 % é o quarto diagnóstico psiquiátrico mais freqüente, superado apenas pelas fobias, depressões e dependência das drogas (Karno e Golding 1988).

Existem diversas formas de TOC, dadas às evidências decorrentes de estudos genéticos, neuroquímicos, farmacológicos, neurorradiológicos e comportamentais. Há então, grande esforço em se encontrar subcategorias desta síndrome. Essas investigações são importantes para ajudar a identificar espectos fenotípicos transmitidos geneticamente, identificar marcadores biológicos, fatores preditivos de prognóstico e também de resposta a tratamento (Miguel e Shavitt, 1996).

Dentre os diversos subtipos possíveis de TOC, um parece estar relacionado à Síndrome de Tourette (ST) e tiques. A ST é uma desordem neuropsiquiátrica definida por tiques motores e vocais persistentes, frequentemente associados com obsessões, compulsões e dificuldade de atenção (Leckman e Cohen 1998).

A presença ou ausência de tiques em pacientes com TOC tem sido alvo de atenção de muitos estudos nessa área. Sugere-se que pacientes com TOC sem tiques apresentam mais freqüentemente rituais de lavagem e preocupações com contaminação ou ameaça à sobrevivência, enquanto

aqueles com tique apresentam tocar compulsivos ou compulsões com o objetivo de atingir certo bem-estar (Leckman e cols.; 1994).

O TOC se caracteriza por obsessões, como sentimentos, idéias, preocupações, dúvidas, crenças supersticiosas excessivas, impulsos ou representações mentais vividos como intrusivas e sem significado particular para o indivíduo. Há também pensamentos estranhos ao seu próprio referencial, embora os reconheça como frutos de seu próprio eu, e que não consiga extingui-los de sua consciência, apesar do desejo de fazê-lo. As compulsões são respostas às obsessões: comportamentos repetitivos e intencionais, cognitivos ou motores, realizados com uma determinação e premência que freqüentemente ultrapassa a livre determinação do indivíduo. As compulsões podem diminuir sentimentos desagradáveis decorrentes das obsessões, como ansiedade, nojo, desconforto e outros (Miguel e Shavitt, 1996).

1.4 Ocitocina e TOC

Há hipóteses que relacionam algumas formas de TOC à liberação central de OT.

Leckman e cols. (1994a), compararam os níveis de OT no líquido de pacientes com TOC, ST e pacientes controles. Os níveis de OT estavam significativamente elevados nos pacientes com TOC em relação, tanto aos controles, como aos pacientes com ST. Foi observada uma correlação significativa entre os níveis de OT e a gravidade dos sintomas obsessivo-compulsivos em todos os grupos estudados, principalmente nos pacientes com TOC não associado a tiques. Altemus e cols. (1999), não conseguiram reproduzir os resultados de Leckman e cols. (1994). Entre um estudo e outro

várias diferenças metodológicas foram observadas, o que pode ter contribuído para diferentes resultados como, o uso prévio de medicamentos, ingestão recente de alimentos, atividade recente e a hora que foi realizada a punção lombar, entre 9 e 10 h da manhã comparado com 12:30 h da tarde no estudo do grupo do Leckman.

Levando-se em conta a heterogeneidade do TOC, é interessante que os níveis de OT só estão aumentados em pacientes com TOC não relacionados a ST. Assim, algumas formas de TOC poderiam ser diretamente influenciadas pela OT e seus mecanismos de ação. O espectro dos sintomas observados no TOC é congruente com aquele dos comportamentos causados pela administração central de OT (Leckman e cols, 1994b).

A administração central de OT em animais de experimentação produz uma série de efeitos como: alterações cognitivas (p.ex. memória), autolimpeza (Del Porto, 1994), comportamentos maternos, afiliativos, agressivos, sexuais e reprodutivos. Esses efeitos da OT podem ter uma relação com sintomas obsessivo-compulsivos como: dúvidas obsessivas, rituais de lavagem, obsessões relacionadas à segurança, agressão e sexo (Leckman e cols, 1994)

Os modelos animais para o estudo do TOC são obtidos pela indução farmacológica de estereotípias ou autolimpeza exagerada (*hypergrooming*), por exemplo, por meio de anfetaminas e OT (Miguel e Shavitt, 1996).

1.5 Comportamento de *grooming* (autolimpeza)

Grooming é um comportamento espontâneo que ocorre em muitas espécies (Sachs, 1988; Spruijt e cols., 1992) e que consiste em lambar e alisar os pêlos do corpo (Fig. 1). Suas finalidades são a limpeza da superfície

corporal, a regulação da temperatura e a interação social, entre outras. Os rituais de limpeza dos obsessivos lembram a seqüência ritualizada do *grooming*, que, uma vez iniciada, transcorre na mesma ordem até o final (Richmond e Sachs, 1980).

Figura 1. Sequências de comportamento de *grooming*. Limpeza de 1) patas, 2) cabeça com patas anteriores, na região entre orelhas e focinho 3) cabeça com patas anteriores, na região do focinho, 4) cabeça com patas anteriores, na região das orelhas e 5) corpo na região ventral, lateral e dorsal.

Leckman e cols. (1994), propõem que o comportamento de *grooming* é complexo e requer cuidado e atenção. Em quase todas as espécies a autolimpeza ocorre em três contextos gerais: como uma reação direta à estimulação ou contaminação periféricas; como uma atividade de

comportamento de deslocamento (*"displacement behavior"*) no momento de indecisão e conflito comportamental; e como uma reação a uma situação recente de ativação, despertar ou estresse (Spruijt e cols., 1992).

Vários peptídeos de origem hipofisária (Drago e Bohus, 1981) e extra-hipofisária (Myamoto e Nagawa, 1977) são capazes de induzir o comportamento de *grooming*. Especificamente a autolimpeza pode ser induzida pela administração intracerebroventricular de peptídeos, tais como o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), hormônio estimulante α -melanócito (α -MSH), β -endorfina, OT (Drago e cols., 1986; Van Wimersma Greidanus e cols., 1988); pela estimulação elétrica da "área hipotalâmica de *grooming*" (HGA) que consiste de partes do PVH e área dorsal hipotalâmica (DHA; Roeling e cols., 1993). Entretanto a autolimpeza exagerada (*hypergrooming*) pode ser induzida pela administração central de OT no núcleo central da amígdala (Gati e Garcia-Cairasco, 2002), intracerebroventricular e na área tegmental ventral (VTA; Nakane e cols., 2003).

A amígdala é uma estrutura subcortical formada por uma coleção heterogênea de grupos nucleares que são coletivamente referidos como corpo amigdalóide. Uma variedade de funções diferentes tem sido atribuída ao corpo amigdalóide, incluindo memória, atenção, interpretação do significado emocional do estímulo sensorial e produção de respostas emocionais apropriadas (Pitkänen e cols., 1997).

A informação sensorial do mundo externo alcança a amígdala primariamente pelo núcleo lateral. O núcleo lateral envia projeções para a maioria dos outros núcleos amigdalóides. As informações são associadas e integradas via conexões de núcleos inter e intra-amigdalóides. O núcleo central

é o maior núcleo de saída das projeções amigdalóides para o tronco encefálico e hipotálamo (Pitkänen e cols., 1997).

Alguns resultados ratificam a escolha da CeA para injeção de OT. Bale e cols (2001), mostraram que a infusão de OT na amígdala central tem efeito ansiolítico; Roeling e cols. (1993), mostraram que a amígdala central recebe eferências da área hipotalâmica de *grooming* e projeções ocitocinérgicas, e Yoshimura e cols (1993), identificaram mRNA de receptores para OT em grande quantidade nesta região (amígdala central e medial). Esta região também se mostra bem destacada pela técnica de *binding* radioativo para receptores de OT (Gimpl e Fahrenholz, 2001). Mais recentemente Terenzi e Ingram (2005), mostraram a expressão de sítios de ligação para OT no CeA determinados pela autoradiografia. Registros eletrofisiológicos do CeA mostraram que os efeitos da OT são quase que exclusivamente excitatórios, o qual corrobora com dados de registros anteriores *in vivo* na amígdala (Condes-Lara e cols., 1994, apud Terenzi e Ingram, 2005) e com registros *in vitro* em outras áreas cerebrais do rato (Ingram e Wakerley, 1993; Raggenbass, 2001; Carter e cols., 2003, apud Terenzi e Ingram, 2005). Além disso, a CeA tem sido proposta como a porção do sistema límbico que coordena as respostas de medo e ansiedade (Davis, 1997; Roozendaal e cols., 1997; LeDoux, 1998).

Tem-se demonstrado que o hipotálamo desempenha um importante papel na integração de comportamentos associados a respostas autonômicas e endócrinas (Swanson, 1987) e que a localização do sítio hipotalâmico estimulado é um determinante para o tipo de comportamento evocado. Utilizando-se a estimulação elétrica de diferentes partes do hipotálamo, tem-se induzido comportamentos diferentes tais como: locomoção, alimentação,

agressão, ingestão de líquidos, cavar e autolimpeza (Jurgens, 1974; Koolhaas, 1978; Lammers e cols., 1987 apud Roeling e cols., 1993). Assim, é concebível que diferentes tipos de comportamentos causados por manipulação do hipotálamo requerem uma diferente ativação de outras partes do cérebro (Roeling e cols., 1993).

Embora tenha sido demonstrada grande relação fisiológica entre a “área hipotalâmica de *grooming*”, autolimpeza exagerada (*hypergrooming*), núcleo central da amígdala e OT, não há até o presente momento a demonstração clara da conexão neuroanatômica entre estes núcleos. A confirmação desta conexão direta entre a “área hipotalâmica de *grooming*” e a amígdala central e os efeitos comportamentais da manipulação desta via são de suma importância para a compreensão dos substratos neurais envolvidos em formas definidas de TOC.

2 Objetivos

1. Induzir um comportamento de autolimpeza exacerbada em ratos Wistar pela microinjeção bilateral de OT no núcleo central da amígdala.

2. Verificar as possíveis conexões entre o núcleo central da amígdala e a “área hipotalâmica de *grooming*”, através de técnicas de mapeamento de vias neurais apoiadas em microscopia de campo claro e fluorescência.

3. Constatar neste modelo a co-localização do peptídeo OT, de seus receptores, e conexões retrógradas após a injeção de *Fluoro-Gold* no núcleo central da amígdala.

4. Discutir os achados comportamentais como possível expressão de circuitos que conectam a amígdala central com estruturas hipotalâmicas ocitocinérgicas.

3 Materiais e métodos

3.1 Animais

Para a realização desse projeto foram utilizados ratos Wistar (n=31), machos, jovens-adultos com peso entre 270 a 330 g, submetidos a um ciclo claro-escuro de 12/12 horas (período claro iniciando às 07:00h), com água e alimentação *ad libitum*. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento para experimentação animal, evitando por todos os meios possíveis o sofrimento e a dor. Os protocolos respectivos encontram-se na Comissão de Ética para Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP para aprovação.

3.2 Cirurgia estereotáxica

Cada animal foi anestesiado com injeção sistêmica de Xilazina (0.07 mg/kg; Bayer, São Paulo, Brazil) e Ketamina (0.1 mg/kg; União Química Farmacêutica Nacional, Embu-Guaçu, Brazil) e injeção local de cloridrato de lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Astra, Cotia, SP). Para prevenção de infecções, ao início da cirurgia cada animal recebeu 0,15 ml de pentabiótico veterinário (FORT DODGE Saúde Animal LTDA, Campinas, SP). Os animais foram tricotomizados e fixados ao aparelho estereotáxico *David Kopf* (modelo 962, Califórnia, USA) e sofreram uma incisão de 1,5 cm na cabeça com um bisturi. Na sequência foi realizada a trepanação craniana no ponto de penetração da cânula e a remoção da dura-máter. Seguiu-se a inserção no cérebro de uma cânula de aço inoxidável, confeccionada a partir de agulha

descartável estéril (Becton Dickinson Indústria Cirúrgica LTDA, Juiz de Fora, MG, Brasil) de 0,35 mm de diâmetro interno e 0,6 mm de diâmetro externo com o tamanho de 15 mm direcionada ao CeA bilateralmente, seguindo as coordenadas (Paxinos e Watson, 1996): anteroposterior -2.0 mm; mediolateral $\pm$ 4.0 mm and dorsoventral: 7.0 mm, referente ao bregma e ao osso. Adicionalmente, foram fixados três parafusos também de aço inoxidável (FST Inc., Califórnia, USA) na calota craniana para suporte mecânico da prótese. Após o implante, a área cirúrgica foi recoberta com acrílico autopolimerizável (DFL Indústria e Comércio LTDA, Rio de Janeiro, RJ), formando um capacete, e as cânulas tampadas com mandril, também de fio de aço inoxidável, para evitar a obstrução da cânula e assim, isolar o cérebro do meio exterior, até o momento da microinjeção.

3.3 Injeção do traçador neuronal retrógrado

Os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para implante de cânula bilateral na CeA. Imediatamente após a cirurgia, foram injetados com 50 nL do traçador neuronal retrógrado autofluorescente, o *Fluoro-Gold* (FG; Fluorochrome, Denver, CO, USA) a 2% em solução de salina (NaCl 0,9%) estéril. Foi utilizada uma seringa de 5 μ L (Hamilton, modelo 95N, Sigma, Nevada, USA) acoplada a uma bomba de microinjeção (Harvard Apparatus, PHD 2000) onde eram fixadas as seringas. Estas se conectavam por meio de tubos de polietileno (PE-10) de 35 cm, à agulha de 16 mm que era introduzida na cânula do rato no momento do experimento. Após a injeção de FG a agulha permaneceu por 7 minutos na cânula. Os animais voltaram para suas caixas e foram levados ao biotério, onde permaneceram durante 3-7 dias para recuperação pós-cirúrgica e migração do traçador.

3.4 Administração bilateral de ocitocina no núcleo central da amígdala

1) Grupo salina /OT

A partir do quarto dia após a cirurgia os animais foram manuseados uma vez ao dia, ao longo de 3 dias, com uma flanela, durante aproximadamente 1 minuto, para a habituação da imobilização e com o experimentador, evitando a quebra da agulha e/ou possíveis ferimentos no momento da injeção. Seguiram-se, então, as injeções que eram sempre bilaterais, utilizando o mesmo sistema de injeção do FG. Os animais foram injetados bilateralmente com 100 nL de salina (controles), ou de ocitocina (dissolvida em 0,5 μ L de salina) a uma velocidade de 0,5 μ L/ minuto. Após as injeções de salina e OT, a agulha permaneceu por 1 minuto na cânula para difusão do líquido. Cada rato foi então colocado numa caixa de acrílico para filmagem do comportamento. As injeções aconteciam sempre depois das 16:00h e primeiro era administrada a salina e no próximo dia a OT (n=9).

2) Grupo salina/ salina

Neste grupo, seguindo o mesmo protocolo dos outros, injetamos salina no primeiro e segundo dia (n= 4).

3) Grupo OT /salina

Segui-se o mesmo protocolo acima, com a diferença na ordem das injeções, sendo primeiro a OT e depois a salina (n= 3).

Utilizou-se OT da Sigma (O-6379) que foi dissolvida em água deionizada autoclavada e estocada a -80°C em alíquotas de 1 μ L (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

A solução peptídica era preparada momentos antes de ser injetada, na concentração de (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), diluída em 1 μL salina isotônica (NaCl 0,9%) estéril.

3.5 Sistema de observação e registro

O sistema de observação e registro era constituído de uma caixa de acrílico (30 x 30 x 30 cm), uma filmadora (Gradiente GCP-180CR, VHS-C, Manaus, Brasil) e um gravador de vídeo cassete (Sony SLV 40 São Paulo, Brasil). O comportamento dos ratos durante a hora seguinte à injeção das drogas foi registrado em fitas de vídeo.

3.6 Quantificação do comportamento de autolimpeza

Os animais tiveram seus comportamentos de autolimpeza quantificados por meio de uma escala ("*grooming score*"), segundo Gispen e cols. (1975). Os vídeos foram observados por 60 minutos após a injeção central de OT ou salina, e os comportamentos categorizados de 15 em 15 s: lambe as patas, a cabeça, a região anogenital, a cauda ou uma outra região do corpo. Para cada uma destas janelas temporais foi atribuído um ponto quando observado algum dos ítems comportamentais de autolimpeza. A soma de pontos dos 60 minutos é o "*grooming score*" cujo valor máximo é de 240 pontos. O comportamento de *grooming* foi expresso graficamente como comportamento total, e numa figura que apresenta a cinética do mesmo.

3.7 Perfusão dos animais

Decorridos 7 dias para a migração do traçador neuronal retrógrado e duas horas após a injeção de OT, cada animal foi anestesiado com tiopental sódico 60 mg/kg (Abbott, São Paulo, SP). A caixa torácica foi aberta com auxílio de uma tesoura e a aorta foi canulada. Em seguida, o rato foi perfundido

com 75 ml de tampão fosfato salina (PBS; fosfato de sódio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) e na sequência com 350 ml de paraformaldeído 4% diluído em PBS (PFA 4%). O cérebro foi retirado e colocado em fixador (PFA 4%) por 2 a 4 horas, e em seguida transferido à solução de sacarose 20% (Merck, Rio de Janeiro, RJ) diluída em PBS para crioproteção. Após submersão na sacarose, os cérebros foram congelados em isopentano 99% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e gelo seco e transferidos para o Freezer -20°C (Kelvinator Scientific, Conway, USA).

3.8 Corte dos cérebros

Os cérebros foram cortados em secções de 20 μm em criostato (Microm HM-550-E, Walldorf, Germany) com temperatura variando de -18° a -22°C . Os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas (solução para gelatinização: gelatina 0,5% e sulfato de cromo-alumínio 0,05%).

3.9 HISTOLOGIA

3.9.1 Histoquímica para *Nissl*

A histoquímica de *Nissl* cora os corpúsculos de *Nissl* localizados no citoplasma celular neuronal, permitindo a identificação do posicionamento das cânulas, usando como referência pranchas do Atlas de Paxinos e Watson (1997). As secções foram hidratadas, colocadas por 1 minuto em banho de acetato de cresil violeta 0,25% e depois lavadas em água corrente por 10 minutos. Em seguida, as secções foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e as lâminas montadas com lamínulas, usando *Entellan* (*Mikroskopie*) como meio de montagem.

3.9.2 Imunofluorescência para ocitocina

A imunofluorescência foi utilizada para marcar OT-peptídeo. O protocolo de imunofluorescência foi padronizado. As secções contendo FG, receberam 2 banhos de 30 minutos em PBS 0,1 M sob agitação, seguido de uma incubação de 10 minutos em glicina 0,1 M diluída em PBS, sob agitação. Seguiram-se novamente 2 banhos de 5 minutos em PBS. As secções foram incubadas por 1 hora, sob agitação leve, em tampão bloqueio PBS 0,1M contendo Triton X-100 (*Sigma*, São Paulo, Brasil) e 1% de soro-albumina bovina (BSA; *Sigma*, São Paulo, Brasil), protegidos da luz. Elas foram, então colocadas em tampão PBS- BSA por 10 minutos e em seguida incubadas com o anticorpo primário feito em coelhos (*rabbit* – α ocitocina; *Peninsula Laboratories, INC*; Belmont, CA) diluído em PBS-BSA na concentração de 1:2000 e deixados na câmara úmida a temperatura ambiente e protegidos da luz até o dia seguinte, (20 h de incubação). O segundo dia de experimento iniciava-se com 6 banhos de 5 minutos em PBS seguidos da incubação com anticorpo secundário feito em cabras (*goat*– α *rabbit*; Alexa 594, *Molecular Probes*; Oregon, USA) diluído em PBS-BSA na concentração de 1:1500, por 1h. As seccões foram novamente lavadas em PBS, 12 vezes de 5 minutos e em seguida foram processadas pela técnica de *binding* (veja abaixo).

Foi feito 1 grupo controle para marcação de OT-peptídeo. Neste grupo controle (n=4) não foi realizado cirurgia estereotóxica, os animais foram perfundidos e seguiu-se o mesmo protocolo de imunofluorescência para OT.

3.9.3 *Binding* para receptores de ocitocina

Para detecção dos receptores para OT utilizamos o peptídeo fluorescente (Fluo-ocitocina, *Advanced-Bioconcept*, OXY011; Boston, USA).

Seguindo as instruções do fabricante, a Flu-ocitocina foi colocada em 10 μ L de DMSO e centrifugada. Quarenta μ L de H₂O destilada foram acrescentados (volume final foi de 50 μ L). Alíquotas foram armazenadas abrigadas da luz, no freezer à -20°C. Ao término da imunofluorescência para a OT, os cortes receberam 2 banhos rápidos em tampão (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM MgCl₂), foram então incubados com tampão isotônico (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 1% BSA, 1 mg/mL de bacitracina) durante 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação leve. As secções foram então incubadas com concentração de 200 nM de fluo-ocitocina diluída no tampão isotônico por 2 h à temperatura ambiente, na câmara úmida e protegidas da luz. O controle foi feito incubando alguns cortes com 40 nM de fluo-ocitocina e 400 nM de OT não marcada para ensaio de competição dos receptores. Após isto, os cortes foram lavados 6 vezes de 2 minutos com tampão (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂). As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e cobertas com lamínulas, utilizando-se como meio de montagem o *Fluoromount G* (*Electron Microscopy Sciences*, Washington, PA).

3.10 Visualização, aquisição de imagens e análise das histologias

Todos os cortes histológicos foram analisados e suas imagens foram adquiridas por 2 sistemas de visualização, aquisição e análise: (I) estereoscópio (*Olympus SZX12*, Melville, USA) acoplado a uma câmera digital (*Olympus DP11*), que armazena as imagens num cartão de memória (*Olympus M-64PIU*) e pode ser lido num adaptador (*Olympus MAUSB-1 – USP Smart Media TM Reader-Writer*) ligado a um computador (*PC Pentium II 500 MHz*). (II) microscópio *Olympus BX-60* com charriot motorizado (*MicroBrightField*, Inc, Colchester, VT, USA) ligado a uma câmera Cool-CCD (*Optronics*, Califórnia,

USA)) que leva as imagens a um computador (*PC Pentium IV*, 1,8 GHz). A digitalização das imagens foi realizada através do programa *Stereo Investigator*, *MicroBrightField*, Inc, Colchester, VT, USA). No caso das imagens de microscopia confocal, a aquisição foi realizada usando microscópio confocal Leica TCS-NT e *software* Leica LCS (ambos, *Leica Microsystems*-Heidelberg, Germany).

3.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *Sigma Stat* (version 2.0, *Systat Software* Inc, Point Richmond, USA). Os dados dos grupos de injeção de OT/salina foram submetidos a um teste de análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, seguido do teste de *Tukey*, quando acumulados em 1 hora de observação. Os mesmos dados foram submetidos a um teste de análise de variância em duas vias (two-way ANOVA) de medidas repetidas, seguido do teste de Bonferroni, quando analisados os dados acumulados de 5 em 5 minutos. O nível de significância usado em todos os testes foi $P < 0,05$. A variação dos resultados observados foi apresentada nos gráficos na forma de média $\pm$ o erro padrão da média (EPM).

Figura 2. Delineamento Experimental.

4 Resultados

4.1 Autolimpeza exacerbada pela ocitocina: *hypergrooming*

Nove (9) ratos foram selecionados para constituírem o grupo OT CeA. Dois animais (r1 e r3) perderam seus capacetes e por isso foram desconsiderados das análises. A histologia dos 9 animais cuja cânula atingiu a amígdala central (r2, r4, r7, r8, r11, r13, r14, r15, r16) é mostrada na Fig. 3 e daqueles em que outras estruturas foram atingidas (r5, r6, r9, r10) encontra-se na Fig. 4. Todos os 9 animais apresentaram aumento do comportamento de autolimpeza após a administração de OT quando comparada com a salina. A análise estatística confirmou que a administração de OT intramigdaliana exacerbou o padrão de autolimpeza (Fig. 5 A). A Fig. 5 B mostra o *grooming score* durante os 60 minutos após a injeção tanto de salina quanto de OT. Pode-se notar que ao longo de todo o decurso a presença da droga induziu um comportamento de autolimpeza nos animais. Aparentemente não parece ocorrer um pico de ação da OT, mas sim uma faixa de atividade máxima entre 25 e 35 minutos após a injeção do peptídeo.

Grupo OT/salina

Três animais fizeram parte deste grupo. A histologia dos 3 animais cujas cânulas atingiram a amígdala central (r4, r7, r8) é mostrada na Fig. 3 e daqueles em que outras estruturas foram atingidas (r1, r2, r3, r5, r6) encontra-se na Fig. 4. A análise estatística mostrou que a injeção de OT no CeA bilateral realizada antes da injeção de salina, também exacerbou o padrão de autolimpeza (Fig. 6 A). A Fig. 6 B mostra o *grooming score* durante os 60 minutos após a injeção tanto de OT quanto de salina.

Grupo salina/salina

Quatro animais fizeram parte deste grupo. A histologia dos 4 animais cujas cânulas atingiram a amígdala central (r1, r2, r3, r4) é mostrada na Fig. 3. A análise estatística mostrou que a injeção de salina tanto no primeiro quanto no segundo dia não exacerbou o padrão de autolimpeza comparado com o *hypergrooming* induzido pela injeção de OT (Fig. 7 A). A Fig. 7 B mostra o *grooming score* durante os 60 minutos após as injeções de salina.

Figura 3. Esquemas do atlas Paxinos e Watson (1997) mostrando a localização da ponta das cânulas (asteriscos) no CeA dos ratos Wistar. Ratos r2, r4, r7, r8, r11, r13, r14, r15, r16; do grupo salina/ OT, ratos r4, r7, r8 do grupo OT/salina, e r1, r2, r3, r4 do grupo salina/salina.

Figura 4. Posição das cânulas que não se encontravam no CeA dos ratos Wistar. Esquemas do atlas Paxinos e Watson (1997) mostrando a localização da ponta das cânulas (asteriscos) nos ratos do grupo salina/OT r5, r6, r9, r10 e do grupo OT/salina ratos r1, r2, r3, r5, r6.

Figura 5. Grooming score de animais Wistar (n = 9) após injeções bilaterais de salina e OT no CeA. A, média das respostas $\pm$ EPM. B, decurso do efeito da injeção de salina e de OT na amígdala central sobre o comportamento de autolimpeza. * $P < 0,05$.

Figura 6. *Grooming score* de animais Wistar (n = 3) após injeções bilaterais de salina e OT no CeA. A, média das respostas $\pm$ EPM. B decurso do efeito da injeção de salina e de OT na amígdala central sobre o comportamento de autolimpeza. * $P < 0,05$

Figura 7. *Grooming score* de animais Wistar (n = 12) após injeções bilaterais de salina e OT no CeA. A, decurso do efeito da injeção de salina e de OT na amígdala central sobre o comportamento de autolimpeza. B, média das respostas $\pm$ EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Figura 8. *Grooming score* de animais Wistar (n=4) após injeções bilaterais de salina/salina no CeA. A, média das respostas $\pm$ EPM. B, decurso do efeito da injeção de salina na amígdala central sobre o comportamento de autolimpeza.

4.2 Verificação do sítio de injeção do *Fluoro-Gold*

A localização e extensão do sítio de injeção do *Fluoro-Gold* na amígdala central bilateralmente são mostradas na Figura 9A. Na Figura 9B verificamos marcação no núcleo medial da amígdala, mostrando a conexão entre o complexo amigdalóide pela migração do *Fluoro-Gold*.

Figura 9. Fotomicrografias mostrando em (A) o sítio de microinjeção do Fluoro-Gold no núcleo central da amígdala (CeA) e em (B) a migração do traçador neuronal para o núcleo medial da amígdala (MeA). Barra de escala: 250 μ m.

4.3 Localização de vias aferentes da amígdala central

O local de nosso maior interesse para observar neurônios marcados retrogradamente pela injeção de FG no núcleo central da amígdala é a “área hipotalâmica de *grooming*”. Outros núcleos também foram observados, mostrando que o CeA recebe aferências de grupos neuronais localizados em várias partes do encéfalo (Figura 10). Para todos os 9 animais, as seguintes estruturas foram marcadas bilateralmente:

Figura 10. Fotomicrografias mostrando células com *Fluoro-Gold*. Painel esquerdo: esquema das secções do Atlas Paxinos & Watson, 1997 retângulo achurado (A) núcleo paraventricular talâmico (PVA), (B) núcleo paratenial talâmico (PT), (C) núcleo hipotalâmico periventricular (Pe), (D) núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH), (E) área hipotalâmica dorsal (DHA), (F) área hipotalâmica anterior, central (AHC), (G) área hipotalâmica lateral (LHA), (H) núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH), (I) área tegmental ventral (VTA), (J) substância negra, parte reticular (SNpr), (K) núcleo geniculado medial (MG), (L) núcleo parabraquial lateral (LPB), (M) núcleo dorsal da rafe (DR), (N) caudado-putamen (Cpu), (O) núcleo do leito da estria terminal (BST) e (P) núcleo medial da amígdala (MeA). Barra de escala: 250 µm.

Hipotálamo: Núcleo periventricular (Pe), PVH, DHA, área hipotalâmica anterior, central (AHC), área hipotalâmica lateral (LHA), núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH). O número de células na DHA foi escasso, mas as células estavam fortemente marcadas.

Tálamo: O número de neurônios, bem como a intensidade da marcação foi alta no núcleo paraventricular talâmico (PVA) e no núcleo paratenial talâmico (PT).

Prosencéfalo: O caudado-putamen (Cpu) se mostrou inteiramente marcado e poucas células no núcleo do leito da estria terminal (BSTL).

Sistema límbico: As estruturas límbicas marcadas foram o CeA, mostrando o sítio de injeção e o núcleo medial da amígdala (MeA).

Região mesencefálica, pontina e bulbar: Neurônios marcados bilateralmente foram encontrados na área tegmental ventral (VTA), substância negra parte reticular (SNpr), núcleo geniculado medial (MG), núcleo parabraquial lateral (LPB) e o núcleo dorsal da rafe (DR).

4.2 Co-localização de *Fluoro-Gold* e imunofluorescência para OT

Ao verificarmos que a HGA envia eferências para o CeA, decidimos fazer uma imunofluorescência para OT a fim de confirmar se esses neurônios

destacados pelo FG são ocitocinérgicos. Como resultado encontramos dupla marcação de neurônios na HGA (Figura 11).

Figura 11. Fotomicrografias mostrando co-localização de OT (vermelho) e Fluoro-Gold (azul). Em (A e C) núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH), (D, 40x) maior aumento da área selecionada em (C) e (B e E) área hipotalâmica dorsal (DHA), (F, 40x) maior aumento da área selecionada em (E) no retângulo marcação com Nissl. Barra de escala: 250 μ m.

A técnica de imunofluorescência utilizada para OT marcou vários núcleos. A Figura 12 e 13 mostra o conjunto de fibras e neurônios ocitocinérgicos no hipotálamo. Estes núcleos contêm fibras espalhadas em

várias direções. Muitas dessas fibras contêm varicosidades ao longo do seu curso rostralmente e caudalmente. No hipotálamo rostral, os neurônios ocitocinérgicos estão localizados no PVH e SON, mas também no DHA, AHC, LH, PaPo, Pe e ZI. O sumário da marcação de FG e OT está descrito na Tabela 1.

Figura 12. Montagem digital de fotomicrografias mostrando a localização de OT. (A) núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH), zona incerta (ZI), núcleo supraóptico (SON); (B) área hipotalâmica dorsal (DHA), núcleo paraventricular do hipotálamo, parte posterior (PaPo), área hipotalâmica lateral (LHA) e (C) núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH), área hipotalâmica anterior, central (AHC), núcleo supraóptico (SON). Barra de escala: 250 μm .

Figura 13. Montagem de fotomicrografias mostrando a localização de OT nos núcleos PVH e SON. Barra: 1000 μ m.

Áreas	Neurônios marcados com FG	Neurônios marcados com OT	Neurônios marcados com FG / OT
PVA	X	-	-
PT	X	-	-
PVH	X	X	X
DHA	X	X	X
AHA	X	X	-
LHA	X	X	-
VMH	X	-	-
PaPo	-	X	-
Pe	X	X	-
SON	-	X	-
ZI	-	X	-
VTA	X	-	-
SNR	X	-	-
MG	X	-	-
LPB	X	-	-
DR	X	-	-
MeA	X	-	-
CPu	X	-	-
BSTL	X	-	-

Tabela 1. Indicação de presença (x) ou ausência (-) de marcação simples (FG; OT) ou dupla (FG/OT).

4.3 Co-localização de *binding* e imunofluorescência

Um primeiro piloto foi realizado utilizando animais Wistar. Dois animais foram perfundidos com PFA 4% e tiveram seus cérebros crioprotetidos com sacarose 20%, seguido de *binding* e imunofluorescência para OT. Porém,

alguns neurônios marcados apareceram na região do núcleo supraóptico e paraventricular do hipotálamo. Decidimos repetir o experimento observando o CeA, que segundo a literatura, tem grande quantidade de receptores de OT. Como resultado não encontramos marcação no CeA.

Decidimos fazer simultaneamente a essa técnica uma imunofluorescência para OT a fim de confirmar que estes neurônios destacados pelo *binding* são ocitocinérgicos. O resultado foi a co-localização de células ocitocinérgicas e seus receptores nos núcleos PVH e SON (Figura 13).

Figura 14. Co-localização de OT (vermelho) e seu receptor (verde). (A) receptor para OT no PVH, (B) OT no PVH, (C) co-localização, (D) maior aumento da área selecionada em C, (E) receptor para OT no SON, (F) OT no SON e (G) co-localização. As setas em G mostram dupla-marcação. Barra de escala: 40 µm e (D) 60 µm.

4.4 Animais controles

Quatro ratos constituíram este grupo. Observamos pela análise da imunofluorescência para OT que não houve diferença detectável ao microscópio com relação ao número de células marcadas entre os animais que tiveram cânulas implantadas bilateralmente no CeA e os controles. O uso de outras técnicas como, por exemplo, contagem de células será necessário para detectar diferença no número de neurônios ocitocinérgicos marcados nos núcleos PVH e SON, entre os animais que tiveram um comportamento de autolimpeza exacerbada e os animais que não receberam nenhum estímulo.

Discussão

Este trabalho mostrou claramente que a OT microinjetada bilateralmente no CeA foi capaz de exacerbar a autolimpeza nos ratos Wistar (Figura 7), sugerindo uma ligação entre o CeA e a “área hipotalâmica de *grooming*” que consiste de partes do PVH e DHA (Roeling e cols., 1993).

Injeções centrais de OT têm mostrado que esta provoca diferentes efeitos. Microinjeções bilaterais deste peptídeo na VTA produziram significativamente aumento do comportamento de autolimpeza (Stivers e cols., 1988; Gati e cols., 2005). Administração de OT no ventrículo lateral não só induz a autolimpeza (Drago e cols., 1986; Van Wimersma Greidanus e cols., 1990), mas também ereção peniana, bocejo (Argiolas e cols., 1986), comportamento maternal (Pederson e Prange, 1979) e efeito ansiolítico (Uvnas-Moberg, 1992a; Windle e cols., 1997). Esta ação também foi obtida quando a OT foi injetada na amígdala central (Bale e cols., 2001).

A amígdala central tem sido proposta como a porção do sistema límbico que coordena as respostas de medo e ansiedade (Davis, 1997; Roozendaal e cols., 1997). Vários trabalhos vêm mostrando que esta estrutura expressa grande quantidade de receptores para OT (Gimpl e Fahrenholz, 2001; Bale e cols., 2001; Terenzi e Ingram, 2005). Também são encontradas fibras e terminais ocitocinérgicos nessa região (Sofroniew, 1983). Estudos realizados em nosso laboratório pela primeira vez por Gati e Garcia-Cairasco (2002) mostraram que a administração de OT tanto na amígdala central como intracerebroventricularmente exacerbou o comportamento de *grooming*.

Para investigar essa possível conexão entre o CeA e a HGA foi utilizado o traçador neuronal retrógrado *Fluoro-Gold* determinando as vias aferentes do CeA. Os traçadores fluorescentes são substâncias capazes de emitir fluorescência como resultado da mudança do seu estado de excitação eletrônica devido à absorção da energia luminosa de uma fonte externa (Gregory, 2002). A escolha do FG como traçador retrógrado se deve às excelentes propriedades de preenchimento retrógrado do corpo celular e estabilidade já observada no mapeamento de várias vias neurais. A injeção bilateral do FG no CeA mostrou que neurônios dos núcleos PVH e DHA mandam eferências para o CeA (Figura 10 D e E). A imunofluorescência para OT confirmou que esses neurônios destacados pelo FG eram mesmo ocitocinérgicos (Figura 11). Muitas varicosidades das fibras marcadas “*en passant*” sugerem que fibras hipotalâmicas são capazes de influenciar várias partes do cérebro ao longo do seu caminho (Wouterlood and Groenewegen, 1985). A distribuição de fibras ocitocinérgicas foi tida como um exemplo do sistema peptidérgico que está possivelmente relacionado com o comportamento de *grooming* (Van Wimersma Greidanus e cols., 1990).

A resposta comportamental de *grooming* induzida pela microinjeção de OT no CeA é coincidente também com a marcação de receptores de OT nos núcleos PVH e SON (Fig. 14 A e E). A co-localização de receptores, peptídeo e conexões retrógradas sugerem que o comportamento de autolimpeza pode ser dependente de eferências para o CeA e áreas relacionadas com esse comportamento como PVH e DHA. Encontrar receptores para OT no PVH e SON complementa a idéia de papel auto-regulador da OT sobre sua síntese (Raggenbass, 2001). Também vai ao encontro de evidências indicando que a

OT é excitatória para sua própria secreção (Moss et al., 1984). Por fim, o *binding* para receptores de OT em ratos Wistar revelou grande quantidade destas proteínas nos PVH e SON, situação inusitada segundo os resultados apresentados pela literatura.

Trabalhos já demonstraram projeções recíprocas entre CeA e PVH (Gray e cols, 1989; Palkovits e cols, 1998). O CeA recebe aferências da DHA, mais não do PVH (Roeling e cols, 1993).

O estudo das conexões eferentes do HGA, em relação a outras áreas cerebrais que estão envolvidas no comportamento de autolimpeza, é necessário para o entendimento do papel do hipotálamo na regulação desse tipo de fenômeno. O giro do cíngulo e o hipotálamo são interconectados, e ambos tem sido implicados no TOC e comportamentos compulsivos (Leckman, Goodman e cols., 1994a). O córtex órbito fronal (COF) está intimamente conectado com o giro do cíngulo e outras estruturas límbicas. COF é capaz de desempenhar discriminações sucessivas, ir/não ir, e tarefa de inversão de resposta (Rosvold e Mishkin, 1961 apud Leckman e Cohen, 1998). Lesões nessa região resultam em interferência perseverativa com uma capacidade do animal em fazer mudanças apropriadas no quadro comportamental, e produzem desregulação afetiva e impulsiva, comportamentos socialmente inapropriados. Sintomas obsessivo-compulsivos frequentemente têm conteúdo sexual e agressivo, o qual pode derivar de contribuições funcionais para esse circuito associado a regiões límbicas e paralímbicas como amígdala e hipotálamo. Roeling e cols., (1993), mostram em seu trabalho uma representação esquemática das eferências hipotalâmicas que originam preferencialmente na HGA e áreas que tem sido associadas na literatura com

comportamento de *grooming*. Alguns desses núcleos são mostrados em nosso trabalho pela marcação de FG (Figura 10) sugerindo que o CeA também está associado com esse circuito neuronal, mostrando que esse comportamento não é organizado em centros discretos, mas consiste de uma rede organizada difusamente no *hindbrain* (Berntson e cols, 1988, apud Roeling e cols., 1993).

Alguns trabalhos vêm sugerindo que a OT teria importante papel na neurobiologia do TOC. Embora este fato possa parecer simplista, algumas formas de TOC são diretamente influenciadas pela OT e sistemas relacionados. É atribuído ao sistema serotoninérgico relevante função sobre o TOC em função da eficiência dos inibidores da recaptação de serotonina no tratamento de pacientes (Insel e cols., 1985). Porém, entre 33% e 50% destes não apresentam melhoras em seus quadros clínicos em resposta à administração destas drogas (McDougle e cols., 1993), sugerindo que as alterações neurofisiológicas no TOC não se restringem apenas aos neurotransmissores já mencionados, mas incluem outros sistemas neuroquímicos envolvendo peptídeos como a OT.

Leckman e cols (1994a) compararam os níveis de OT no líquido de pacientes com TOC, ST e controles normais. Encontraram níveis de OT significativamente elevados nos pacientes com TOC em relação tanto aos controles como aos pacientes com ST. Dentre os pacientes com TOC, aqueles com tiques apresentaram níveis de OT semelhantes aos controles e aos pacientes com ST, e marcadamente menores que os pacientes com TOC sem tiques. Foi observada uma correlação significativa entre os níveis de OT e a gravidade dos sintomas obsessivo-compulsivos em todos os grupos estudados, principalmente nos pacientes com TOC não associado a tiques, onde há

possibilidade do envolvimento de outros sistemas neuroquímicos. Altemus e cols, (1999), mostraram que embora os níveis de OT no líquido não se diferem entre pacientes com TOC e sujeitos controles, isso não descarta a possibilidade de diferenças na atividade do neuropeptídeo em circuitos neurais específicos relevantes à fisiopatologia do TOC. Justamente o presente trabalho se baseia na caracterização de circuitos cerebrais tendo a ocitocina como um típico agente neuroquímico. Trabalho recente na área clínica mostra dados de imagem (tomografia de emissão de pósitrons; PET) com aumento na atividade da amígdala esquerda e no córtex bilateral estriatal de pacientes nos quais foi provocada a sintomatologia de TOC (van den Heuvel e cols., 2005).

A síntese de OT ocorre no hipotálamo, nos núcleos PVH e SON. Estes emitem projeções para a neuro-hipófise e outras regiões, como o sistema límbico em ratos. Receptores para OT foram encontrados nos núcleos PVH e SON (Fig. 14 A e E), sabe-se também que existem receptores no CeA (Gimpl e Fahrenholz, 2001). A administração central de OT em animais se reflete em diversos domínios cognitivo-comportamentais produzindo uma série de efeitos como: alterações cognitivas (por ex. memória), *grooming* (Del Porto, 1994), comportamentos maternos, afiliativos, agressivos, sexuais e reprodutivos (Leckman e cols., 1994).

Esses efeitos da OT podem ter uma relação com sintomas obsessivo-compulsivos como: dúvidas obsessivas, rituais de lavagem, obsessões relacionadas à segurança, agressão e sexo (Leckman e cols., 1994).

Os níveis aumentados de OT só foram observados em pacientes com TOC não relacionado à ST. O modelo animal para o estudo de um subtipo de TOC que nós propomos pode ser diretamente influenciado pela OT e sistemas

a ela relacionados, assim como algumas formas de TOC. O espectro dos sintomas observados no TOC é congruente com o espectro dos comportamentos provocados pela administração central de OT, por exemplo, o efeito da OT em animais intensifica o comportamento de *grooming* (Figura 7) e a sua relação com sintomas obsessivo-compulsivos são rituais de lavagem.

Hastings (1991, apud Leckman e cols., 1994) sugere um mecanismo que pode ser responsável pela relação entre TOC e OT. Uma situação provocadora ou uma dúvida “normal” induziria liberação de OT em regiões límbicas e autonômicas. Nessas regiões o peptídeo exacerbaria pensamentos inaceitáveis resultando nas preocupações frequentes e intrusivas, assim como impulsos sexuais e agressivos. Dadas as propriedades de retroalimentação positiva desse sistema sob certas condições fisiológicas (Yamashita e cols., 1987), a OT poderia ainda sensibilizar o sistema levando à sua maior liberação. O desconforto associado a essas preocupações e os níveis aumentados de OT central resultaria, pelo menos em parte, na realização de rituais compulsivos, particularmente a autolimpeza e as compulsões de verificação. Estes rituais trariam alívio, porém despertaria novamente o sistema. Essa hipótese é uma extensão da teoria da redução da ansiedade de TOC proposta pela primeira vez por Dollard e Miller, 1950, sendo que a ansiedade ou desconforto gerado pelos pensamentos obsessivos motivariam a realização dos rituais ou compulsões, e que esses atos seriam reforçados pela redução que produzem no desconforto. Tal teoria é apoiada por evidências empíricas de que o desconforto subjetivo gerado pela exposição a uma situação provocadora diminui com a realização de atos compulsivos. Dessas idéias derivam, em

parte, inúmeras técnicas de terapia cognitivo-comportamental que se mostram eficazes no tratamento do TOC.

Nossos dados experimentais corroboram esta hipótese, como mostrado nas Figuras 10 e 11, nas quais é demonstrado a influência de estruturas límbicas (CeA) no comportamento de *grooming*. Adicionalmente, nossos dados reforçam que estas áreas límbicas também recebem projeções do tronco encefálico e HGA, sugerindo um possível substrato neuroanatômico de um subtipo de TOC relacionado a OT.

O estudo de circuitos neuronais relacionados à organização do comportamento é importante para o entendimento dos mecanismos subjacentes a respostas comportamentais como o TOC. Os dados presentes sugerem que o CeA é uma importante parte dos circuitos que incluem regiões hipotalâmicas e extrahipotalâmicas, responsáveis pelo comportamento de autolimpeza exagerada. Finalmente, novas técnicas que vão além das fronteiras entre fisiologia, comportamento e anatomia, tais como a expressão de c-Fos, eletrofisiologia e lesão de núcleos seletivos podem ser ferramentas úteis para estudos adicionais dos mecanismos e circuitos cerebrais envolvidos na regulação de comportamento normal e de situação patológica como o TOC dependente de OT.

5 Conclusões

1. Neste trabalho mostramos que a microinjeção de OT no CeA intensificou o comportamento de *grooming*, considerado um sintoma do TOC.

2. Nossos dados sugerem uma associação anatômica entre o CeA e PVH e DHA, que são áreas hipotalâmicas de *grooming*.

3. A co-localização de OT (pela imunofluorescência), receptor para OT (pelo ensaio de *binding*) e neurônios marcados retrogradamente depois da injeção de FG no CeA sugere que a CeA e conexões são um importante substrato da circuitaria subjacente a este comportamento dependente de OT, possivelmente um modelo animal para estudos de um subtipo de TOC.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altemus, M.; Jacobson, K.R.; Debellis, M.; Kling M.; Pigott, T.; Murphy, D.L. e Gold, P. W. (1999). Normal CSF oxytocin and NPY levels in OCD. *Biol. Psychiatry*, 45:931-933.

Arletti, R.; Benelli, A. e Bertolini, A. (1989). Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. *Peptides*, 10: 89-93.

Arletti, R. e Bertolini, A. (1987). Oxytocin acts as an antidepressant in two animal models of depression. *Life Sciences*, 41: 1725-1730.

Bale, T.L.; Davis, A.M.; Auger, A.P.; Dorsa, D.M. e McCarthy, M.M. (2001). CNS region-specific oxytocin receptor expression: importance in regulation of anxiety and sex behavior. *Journal of Neuroscience*, 21: 2546-2552.

Bohus, B.; Kovacs, G.L. e Wied, D. (1978). Oxytocin, vasopressin and memory: opposite effects on consolidation and retrieval processes. *Brain Research*, 157: 414-417.

Cameron, J.L.; Pomerantz, S.M.; Layden, L.M. e Amico, J.A. (1992). Dopaminergic stimulation of oxytocin concentration in the plasma of male and female monkeys by apomorphine and D₂ receptor agonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 75: 855-860.

Davis, M. (1997). Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. *J. Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, 9: 382-402.

Devries, A.C.; Young, W.S. e Nelson, R.J. (1997). Reduced aggressive behaviour in mice with targeted disruption of the oxytocin gene. *J. Neuroendocrinol.*, 9: 363-368.

Del Porto, J.A. (1994). Distúrbio obsessivo-compulsivo: fenomenologia clínica de 105 pacientes de estudo de aspectos trans-históricos e transculturais. São Paulo. Tese (livre-docência) – Escola Paulista de Medicina.

Drago, F. e Bohus, B. (1981). Hyperprolactinaemia-induced excessive grooming in the rat: time course and element analysis. *Behav. Neurol. Biol.*, 33: 117-122.

Drago, F.; Pederson, C.A.; Caldwell, J.D. e Prance, A.J.J.R. (1986). Oxytocin potently enhance novelty-induced grooming behavior in the rat. *Brain Research*, 368: 287-295.

Gati, C.D.C. e Garcia-Cairasco, N. (2002). Indução de hypergrooming por meio de microinjeção de OT na amígdala central: um possível modelo de transtorno obsessivo-compulsivo? Resumos da XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, cd-rom. Salvador, Brasil.

Gimpl, G. e Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological Reviews*, 81: 629-683.

Gispen, W.H.; Wiegant, V.M.; Greven, H.M. e Wied, D. (1975). The induction of excessive grooming in the rat by intraventricular application of peptides derived from ACTH: structure-activity studies. *Life Sci.*, 17: 645-652.

Karno, M.; Golding, J.; Sorensen, S. e Burnam, A. (1988). The epidemiology of obsessive-compulsive disorders in five US communities. *Arch Gen Psychiatry*, 45: 94-99.

Leckman, J.F.; Goodman, W.K.; North, W.G.; Chappell, P.B.; Price, L.H.; Pauls, D.L.; Anderson, G.M.; Riddle, M.A.; McSwiggan-Hardin, M.; McDougle, C.J.; Barr, L.C. e Cohen, D.J. (1994). Elevated cerebrospinal fluid levels of oxytocin in obsessive-compulsive disorder: comparison with Tourette, s syndrome and healthy controls. *Archives of General Psychiatry*, 51: 782-729.

Leckman, J.; Goodman, W.K., North, W.G., Chappell, P.B., Price, L.H.; Pauls, D.L.. Anderson, G.M.; Riddle, M.A.; McDougle, C.J.; Barr, L.C. e Cohen, D.J. (1994). The role of central oxytocin in obsessive-compulsive disorder and related normal behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 19: 723-749.

Leckman, J.F. e Cohen, D.J. (1998). *Tourette's Syndrome-Tics, Obsessions, Compulsions, developmental, psychopathology and clinical care.* USA.

LeDoux, J. (1998). Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol Psychiatry*, 44: 1229-1238.

Melis, M.R., Argiolas, A.; Stancampiano, R. e Gessa, G.L. (1990). Effect of apomorphine on oxytocin concentrations in different brain areas and plasma of male rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 182: 101-107.

Miguel, E.C. e Shavitt, R.G. (1996). Neurobiologia do transtorno obsessivo-compulsivo. In: *Transtornos do espectro obsessivo-compulsivo* (Miguel EC, ed). Editora Guanabara, Rio de Janeiro, pp 51-71.

Miyamoto, M. e Nagawa, Y. (1977). Mesolimbic involvement in the locomotor stimulant action of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rats. *European Journal Pharmacology*, 44: 143-152.

Nakano, F.N.; Gati, C.D.C. e Garcia-Cairasco, N. (2003). Indução do comportamento de hypergrooming pela injeção de ocitocina na área tegmental ventral (VTA): análise comparativa entre ratos Wistar e da cepa Wistar Audiogenic Rat (WAR). Resumo da XI Reunião Anual do Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. Ribeirão Preto, Brasil.

Numan, M. (1994). Maternal behavior. In: *Physiology of reproduction* (Knobiel E, Neill JD, eds) Raven Press: New York, pp 221-301.

Paxinos, G. e Watson, C. (1997). The rat brain in stereotaxic coordinates. Second edition. Academic Press: San Diego.

Pitkänen, A.; Savander, V. e LeDoux, J.E. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci*, 20: 517-523.

Reeves, W.B. e Adreoli, T.E. (1992). The posterior pituitary and water metabolism. In: *Williams Textbook of Endocrinology* (Wilson, JD, Foster DW, eds) Saunders Company: Philadelphia, pp 311-356.

Richmond, G. e Sachs, B.D. (1980). Grooming in Norway rats: the development of an adult expression of a complex motor pattern behavior. *Behavior*, 75: 82-95.

Roeling, T.A.P.; Veening, J.G.; Peters, J.P.W.; Vermelis, M.E.J. e Nieuwenhuys, R. (1993). Efferent connections of the hypothalamic “grooming area” in the rat. *Neuroscience*, 56: 199-225.

Roozendaal, B.; Koolhaas, J.M. e Bohuns, B. (1997). The role of the central amygdala in stress and adaption. *Acta Physiol Scand*, 640: 51-54.

Sachs, B.D. (1988). The development of grooming and its expression in adult animals. *Ann. NY Acad. Sci.*, 525: 1-17

Sofroniew, M.V. (1983). Morphology of vasopressin and oxytocin neurons and their central and vascular projections. *Prog. Brain Research*, 60: 101-114.

Spruijt, B.M.; Van Hooff, J.A.R.A.M., Gispen, W.H. (1992). Ethology and neurobiology of *grooming* behavior. *Physiological Reviews*, 3: 825-852.

Swanson, L.W. (1987). The hypothalamus. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (Bjorklund A, Hokfelt T, Swanson LW, ed). Elsevier, Amsterdam, vol. 5, part I, pp 1-124.

Terenzi, M. G. e Ingram, C. D. (2005). Oxytocin-induced excitation of neurons in the rat central and medial amygdaloid nuclei. *Neuroscience* , 134: 345-354.

Uvnäs-Moberg, K.; Ahlenius, S.; Hillegaart, V. e Alster, P. (1994). High doses of oxytocin cause sedation and low doses cause an anxiolytic-like effect in male rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49: 101-106.

Uvnäs-Moberg, K.; Alster, P.; Hillegaart, V. e Ahlenius, S. (1992). Oxytocin reduces exploratory motor behaviour and shifts the activity towards the center of the arena in male rats. *Acta Physiol. Scand.*, 145: 429-430.

Uvnäs-Moberg, K., Bruzelius, G.; Alster, P.; Bileviciute, I. e Lundeberg, T. (1992). Oxytocin increase and a specific oxytocin antagonist decrease pain threshold in male rats. *Acta Physiol. Scand.*, 144: 487-488

van den Heuvel, O.; Veltman, D. J.; Groenewegen, H. J.; Dolan, R. J.; Cath, D. C.; Boellaard, R.; Mesina, C. T.; van Balkom, A. J.L.M.; van Oppen, P.;

Witter, M. P.; Lammertsma, A. A. e van Dyck, R. (2005). Amygdala activity in obsessive-compulsive disorder with contamination fear: a study with oxygen-15 water positron emission tomography. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 132: 225-237.

Van Wimersma Greidanus, Tj.B.; Van de Brug, F. e De Bruyckere, L.M. (1988). Comparison of bombesin, ACTH- and β -endorphin-induced *grooming*. Antagonism by haloperidol, naloxone and neurotensin. *Ann. NY Acad. Sci*, 525: 219-227.

Yoshimura, R.; Kimura, T.; Araki, T.; Maeno, H.; Tanizawa, O. e Tohyama, M. (1993). Localization of oxytocin receptor Messenger ribonucleic acid na the rat brain. *Endocrinology*, 133 (3): 1239-1246.