CIBELE CARLA GUIMARÃES DE SOUZA

“O papel do núcleo pré-mamilar ventral na organização do comportamento agressivo maternal”

Dissertação apresentada ao
Departamento de Anatomia do Instituto
de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

**São Paulo
2011**

CIBELE CARLA GUIMARÃES DE SOUZA

“O papel do núcleo pré-mamilar ventral na organização do comportamento agressivo maternal”

Dissertação apresentada ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Newton Sabino Canteras

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Souza, Cibeles Carla Guimarães de.

O papel do núcleo pré-mamilar ventral no comportamento agressivo
maternal / Cibeles Carla Guimarães de Souza. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Newton Sabino Canteras.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de
concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa:
Neuroanatomia funcional.

Versão do título para o inglês: Role of the ventral premamillary
nucleus in the maternal aggressive behavior.

Descritores: 1. Agressão maternal 2. Núcleo pré-mamilar ventral 3.
Comportamento maternal I. Canteras, Newton Sabino II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB071/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cibeles Carla Guimarães de Souza.

Título da Dissertação: O papel do núcleo pré-mamilar ventral no comportamento agressivo materno.

Orientador(a): Newton Sabino Canteras.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.030.09

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 130/05/CEEA datado de 29.11.05, por solicitação do Prof. Dr. Newton Sabino Canteras, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Cibele Carla Guimarães de Souza** ao projeto de pesquisa "*Bases neurais dos componentes motivados*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 18 de junho de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador -CEEA- ICB/USP

*Ao meu pai, Orlando e a minha mãe, Elizabeth por estarem sempre do
meu lado. Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Orlando e Elizabeth, pela educação, pelo apoio e por sempre estarem ao meu lado.

Aos meus irmãos, Débora e Bruno e a minha afilhada Jady, pelos inúmeros momentos de alegria.

Ao meu segundo pai, Antônio e a tia Marly, uma segunda mãe, pelo incentivo, amor e dedicação.

Ao meu orientador Newton pela oportunidade e confiança.

A Márcia, pela paciência e companheirismo. Sempre que precisei estava ao meu lado, uma pessoa que foi muito importante no desenvolvimento deste trabalho. Não sei o que seria da minha vida sem a Marcinha!

A Sandra, pelas conversas, pelo apoio. Sempre com dicas importantes.

A Simone, também uma pessoa importante no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Wagner por todo apoio e carinho, principalmente por agüentar as minhas reclamações, com certeza um irmão mais velho. Valeu pela paciência!

A Isadora, a Amanda, a Cláudia e ao Miguel pela companhia e por todos os momentos agradáveis que passamos no laboratório.

A todos os funcionários do Departamento de Anatomia, que de alguma forma me ajudaram.

“O cérebro é o melhor brinquedo já criado, nele se encontram todos os segredos! Inclusive a felicidade.”

(Charles Chaplin, 1889-1977)

RESUMO

Souza CGS. O papel do núcleo pré-mamilar ventral na organização do comportamento agressivo maternal. [dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A agressão maternal tem como função preservar a vida da prole (Archer, 1988). O desenvolvimento desse comportamento depende vastamente do reconhecimento do adversário como uma ameaça potencial e esse reconhecimento envolve a detecção de pistas feromonais (Halpern e Martinez-Marco, 2003). O núcleo pré-mamilar ventral (PMv) é um dos principais alvos do núcleo medial da amígdala, que representa o setor amigdalár crítico para o processamento de pistas feromonais (Canteras et al., 1992). Desta forma, postulamos que possivelmente o PMv seja sensível às pistas feromonais do macho intruso, servindo como uma possível interface para os sistemas neurais envolvidos na agressão maternal. Neste sentido, inicialmente avaliamos o padrão de ativação do PMv, bem como alguns de seus alvos de projeção, durante o comportamento maternal e durante a agressão maternal. Notamos que tanto o PMv como a maioria de seus alvos principais (tais como, o núcleo posterior da amígdala, a parte posterodorsal do núcleo medial da amígdala, a área hipotalâmica lateral tuberal e a parte ventrolateral do núcleo ventromedial) apresentam um aumento significativo na expressão da proteína Fos durante a agressão maternal. Em seguida, avaliamos o papel do PMv na organização neural do comportamento de agressão maternal, em ratas lactantes portadoras de lesões citotóxicas com NMDA do PMv. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que as fêmeas lactantes com lesão no PMv não apresentam qualquer alteração nos parâmetros comportamentais relacionados ao comportamento maternal, mas apresentam uma significativa diminuição no comportamento agressivo maternal. Observamos ainda, que a lesão citotóxica do PMv resultou numa drástica diminuição da expressão da proteína Fos em alguns sítios de projeção do PMv que se apresentavam mobilizados durante a agressão maternal (tais como a parte ventrolateral do hipotálamo ventromedial, a área hipotalâmica lateral tuberal e o núcleo pré-óptico medial), sugerindo a participação destes sítios neurais como críticos na expressão do comportamento de agressão maternal.

Palavras-chave: Agressão Maternal. Núcleo pré-mamilar ventral. Comportamento maternal.

ABSTRACT

Souza CGS. Role of the ventral premamillary nucleus in the maternal aggressive behavior. [Masters thesis (Morfofunctional sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Maternal aggression is critical to preserve the litters from male intruders (Archer, 1988) and the pheromonal cues from the males are important to drive such responses (Halpern e Martinez-Marco, 2003). The ventral premamillary nucleus (PMv) is one of the main targets of the medial amygdalar nucleus, and is critically involved in processing pheromonal information (Canteras et al., 1992). In this regard, in the present study, we investigated whether the PMv would work as a putative interface between the pheromonal processing of the male intruder and the neural sites potentially involved in the expression of maternal aggression. First, we analyzed the pattern of Fos expression in dams expressing aggressive maternal behavior, and found a significant increase in Fos levels in the PMv, as well as, in most of its main targets, such as the posterior amygdalar nucleus, the posterodorsal part of the medial amygdalar nucleus, the tuberal nucleus of the lateral hypothalamic area, and the ventrolateral part of the ventromedial nucleus. Next, we examined how NMDA lesions bilaterally placed in the PMv would interfere in maternal aggression, and found that dams bearing those lesions presented a significant reduction in the expression of aggressive behavior, but showed no alterations on the maternal behavior responses. Moreover, we were able to see that PMv lesions resulted in significant drop in Fos expression in selected PMv targets, namely the tuberal nucleus of the lateral hypothalamic area and the ventrolateral part of the ventromedial nucleus, likely to be critically involved in the expression of the maternal aggression. Overall, the present results support the idea that the PMv is seemingly a key site in the network controlling maternal aggression; on one hand, the nucleus is likely to processes pheromonal cues from the intruder male, and, on the other, it conveys this information to sites critically related to the expression of maternal aggression.

Key-words: Maternal Aggression. Ventral Premamillary Nucleus. Maternal Behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Delineamento experimental desde o acasalamento até o teste comportamental das ratas lactantes dos grupos Agressão Maternal/Intacto e Maternal.....28

Figura 2- Delineamento experimental desde o acasalamento até o teste comportamental das ratas lactantes do grupo Lesão PMv.....28

Figura 3- Fotomicrografia em campo claro de corte frontal de encéfalo de rata lactante exposta a um macho intruso e fêmea lactante sem o encontro com o intruso, ao nível da região pré-mamilar do hipotálamo. Cortes imunorreagidos para a proteína Fos.....33

Figura 4- Densidade de células imunorreativas à proteína Fos (n° de células/ mm^2) do núcleo pré-mamilar ventral (PMv); parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico (VMHvl); área hipotalâmica lateral tuberal (LHA_{tu}); região postero-dorsal do núcleo medial da amígdala (MEA_{pd}); núcleo posterior da amígdala (PA) e núcleo pré-optico medial (MPN) na expressão do comportamento maternal (Maternal; n=5) e na agressão maternal (Agressão Maternal; n=5).....35

Figura 5- Densidade de células imunorreativas à proteína Fos (n° de células/ mm^2) da parte ventral do núcleo septal lateral (LSv); do núcleo principal da estria terminal (BST_{pr}) e do núcleo periventricular anteroventral do hipotálamo (AVPV) na expressão do comportamento maternal (Maternal; n=5) e na agressão maternal (Agressão Maternal; n=5).....36

Figura 6- Fotomicrografia em campo claro de corte frontal de encéfalo de rata lactante corado pelo método de Nissl caracterizada por perda celular e gliose (demarcada pelas setas); corte imunorreagido para NeuN, ilustrando a extensão da lesão bilateral do núcleo pré-mamilar ventral.....38

Figura 7- Parâmetros do comportamento maternal observados nos primeiros dias de lactação em ratas sem lesão do PMv (Intacto; n=5) e de fêmeas com lesão do PMv (Lesão PMv; n=5). Frequência em que a rata permaneceu amamentando os filhotes, frequência que a rata permaneceu com mais da metade da ninhada, frequência que a rata permaneceu no ninho, frequência que a rata fez *grooming* nos filhotes e frequência que a rata apresentou comportamentos não maternais.....39

Figura 8- Avaliação da resposta de ataque de ratas lactantes sem lesão do PMv (Intacto; n=5) e ratas com lesão do PMv (Lesão PMv; n=5) expostas ao macho intruso. Latência (s) para o primeiro ataque, frequência dada pelo número de vezes em que as ratas apresentaram a resposta de ataque durante os 5 minutos de teste, duração do tempo total em que as ratas expressaram o ataque.....40

Figura 9- Avaliação de outros comportamentos agressivos de ratas lactantes sem lesão do PMv (Intacto; n=5) e ratas lactantes com lesão no PMv (Lesão PMv; n=5) expostas ao macho intruso. Tempo total em que as fêmeas apresentaram a postura lateral durante os 5 minutos de teste, frequência dada pela média do número total de vezes em que as ratas apresentaram o *grooming* agressivo.....41

Figura 10- Avaliação dos comportamentos não agressivos de ratas lactantes sem lesão do PMv (Intacto; n=5) e ratas lactantes com lesão no PMv (Lesão PMv; n=5) expostas ao macho intruso. Tempo total em que as fêmeas apresentaram *sniffing*, exploração, *self-grooming* e outros comportamentos.....42

Figura 11- Densidade de células imunorreativas à proteína Fos (nº de células/mm²) da área hipotalâmica lateral tuberal (LHA_{tu}); parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico (VMH_{vl}); região postero-dorsal do núcleo medial da amígdala (MEA_{pd}) e (D) núcleo pré-optico medial (MPN) de ratas lactantes sem lesão do PMv (Intacto; n=5) e ratas lactantes com lesão do PMv (Lesão PMv; n=5), expostas ao macho intruso.....45

Figura 12- Densidade de células imunorreativas à proteína Fos (nº de células/mm²) do (A) núcleo periventricular anteroventral do hipotálamo (AVPV); (B) núcleo principal da estria terminal (BST_{pr}); (C) parte ventral do núcleo septal lateral (LS_v) e

(D) núcleo posterior da amígdala (PA) de ratas lactantes sem lesão do PMv (Intacto; n=5) e ratas lactantes com lesão do PMv (Lesão PMv; n=5), expostas ao macho intruso.....46

Figura 13- Fotomicrografia em campo claro de corte frontal de encéfalo de rata lactante, ilustrando a imunorreatividade à proteína Fos na região tuberal de fêmeas sem lesão e com lesão do PMv. Notar nas ratas lactantes com lesão do PMv uma grande redução do número de células Fos-positivas na região da parte lateral do núcleo ventromedial (VMHvl) e na região adjacente do hipotálamo lateral tuberal (LHA_{tu}).....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Densidade de células imunorreativas à proteína Fos (n° de células/mm²) do núcleo pré-mamilar ventral (PMv); da parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico (VMHvl); da área hipotalâmica lateral tuberal (LHA_{tu}); da região pósterio-dorsal do núcleo medial da amígdala (MEA_{pd}); do núcleo periventricular anteroventral (AVPV); do núcleo principal da estria terminal (BST_{pr}); da parte ventral do núcleo septal lateral (LSv); do núcleo pré-optico medial (MPN) e do núcleo posterior da amígdala (PA), de fêmeas lactantes no comportamento maternal (Maternal) e de ratas lactantes sem lesão expostas ao macho intruso (Agressão Maternal).....34

Tabela 2- Análise dos comportamentos agressivos e não agressivos de ratas lactantes intactas e ratas lactantes com lesão do PMv, expostas ao macho intruso.....43

Tabela 3- Densidade de células imunorreativas à proteína Fos (n° de células/mm²) da parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico (VMHvl); da área hipotalâmica lateral tuberal (LHA_{tu}); da região postero-dorsal do núcleo medial da amígdala (MEA_{pd}); do núcleo periventricular anteroventral do hipotálamo (AVPV); do núcleo principal da estria terminal (BST_{pr}); da parte ventral do núcleo septal lateral (LSv); do núcleo pré-optico medial (MPN) e do núcleo posterior da amígdala (PA) de ratas lactantes sem lesão do PMv (Intacto; n=5) e ratas lactantes com lesão do PMv (Lesão PMv; n=5), expostas ao macho intruso.....47

LISTA DE ABREVIATURAS

IIIV- terceiro ventrículo

AVPV- núcleo periventricular anteroventral do hipotálamo

BSTpr- núcleo principal da estria terminal

LHA_{tu}- área hipotalâmica lateral tuberal

LS_v- parte ventral do núcleo septal lateral

MEA- núcleo medial da amígdala

MEAp_d- parte postero-dorsal do núcleo medial da amígdala

MPN- núcleo pré-óptico medial

MPO- área pré-óptica medial

PA- núcleo posterior da amígdala

PM_d- núcleo pré-mamilar dorsal

PM_v- núcleo pré-mamilar ventral

VMH- núcleo ventromedial hipotalâmico

VMH_{vl}- parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Animais.....	26
3.2 Acasalamento.....	26
3.3 Lesão Citotóxica por NMDA.....	26
3.4 Nascimento e padronização da Ninhada.....	27
3.5 Delineamento experimental.....	27
3.6 Perfusão e Histologia.....	29
3.7 Reação imunoistoquímica para detecção da proteína Fos.....	29
3.8 Quantificação de células Fos positivas.....	30
3.9 Análise Estatística.....	30
4 RESULTADOS.....	311
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

O comportamento maternal, uma das categorias do comportamento parental exibido pelas fêmeas, consiste em cuidar de outro indivíduo neonato e imaturo da mesma espécie, até que este atinja uma maturidade capaz de garantir a sua própria sobrevivência. À medida que o filhote se desenvolve e se torna independente, a expressão do comportamento maternal das fêmeas diminui, até se tornar ausente (Numan, 1994). Assim, está bem estabelecido que os parâmetros característicos do comportamento maternal são mais intensos na primeira semana pós-parto do que nas semanas seguintes (Slamberová et al., 2001). Em roedores, os cuidados podem se referir diretamente aos filhotes como o agrupamento, limpeza e aleitamento ou indiretamente, como a construção do ninho e agressão maternal (Numan, 1994).

A agressão é parte do repertório natural das respostas comportamentais que os animais utilizam para lidar em seu ambiente (Huntingford, 1989). A função defensiva do comportamento agressivo pode contribuir para a remoção de um perigo imediato, onde o animal corre risco de lesões físicas (Archer, 1988).

A proteção feroz da prole é um comportamento com grande significância adaptativa, uma vez que é expresso por inúmeras espécies, desde peixes (Crawford e Balon, 1996) até humanos (Ledesma et al., 1988). Em roedores o infanticídio por co-específicos não parentais é bastante comum (Agrell et al., 1998). Na agressão maternal a fêmea irá atacar os machos intrusos que se aproximarem de sua prole a fim de preservar a vida de seus filhotes, sendo então um comportamento que tem como objetivo proteger a ninhada, não sendo uma agressão competitiva, como a agressão territorial onde o animal visa adquirir recursos (Archer, 1988).

Dados de literatura mostram que o comportamento agressivo vem sendo amplamente relatado, sendo a maioria dos dados experimentais obtidos em roedores (Numan, 1994). Dessa forma, as informações acerca dos mecanismos de controle da agressão maternal e de outros comportamentos maternos são melhores compreendidos em ratos (Mann et al., 1984; Stern e McDonald, 1989).

Em ratas lactantes, a forma e a topografia do ataque a um intruso diferem à apresentada por machos dominantes em seu território (Blanchard et al., 1984; Flannelly e Flannelly, 1987; Haney et al., 1989; Mos et al., 1989; Blanchard e Blanchard, 1990). As fêmeas utilizam o ataque lateral sucedido de manter-se sobre o intruso, enquanto esse intruso expõe o ventre deitado sobre seu dorso. Ao contrário do observado em machos dominantes, uma alta percentagem das mordidas das fêmeas direcionada a cabeça e para a região do focinho do intruso. Também na

agressão maternal as fêmeas apresentam o comportamento de investigação do focinho e das orelhas do macho com o nariz e a boca (grooming agressivo) e pular sobre o intruso (jump-attack), que não é visto em machos dominantes contra intrusos (Leyhausen, 1973; Blanchard e Blanchard, 1981, 1988, 1989; Lonstein e Stern, 1997). Além disso, as fêmeas podem mostrar um tipo de agressão territorial em direção a outras fêmeas, mas esta é muito menos feroz do que a demonstrada na agressão maternal frente a um macho intruso (Parmigiani et al., 1988).

Muitos são os fatores que modulam o comportamento agressivo maternal em fêmeas lactantes. Existem mudanças na fisiologia da fêmea durante a lactação que exercem grande impacto sobre esse comportamento, tais como, a ampla flutuação hormonal das ratas durante o pré e o pós-parto e as mudanças neuroquímicas que esses hormônios produzem; as pistas, principalmente táteis e olfatórias, provenientes dos neonatos, os sinais olfatórios oriundos dos machos intrusos e as pistas ambientais em que os animais estão situados (Gammie e Lonstein, 2005), como a luminosidade e a habituação do animal ao ambiente.

Poucos são os trabalhos da literatura acerca do circuito neural envolvido no comportamento agressivo maternal. Estudos envolvendo lesões eletrolíticas do tálamo mediodorsal ou do córtex insular pré-frontal diminuíram a agressão maternal (Ferreira et al., 1987), uma vez que embora não tenham produzido anosmia, prejudicaram a habilidade de fazer discriminações olfatórias, ou seja, o reconhecimento pela fêmea lactante do animal intruso como uma ameaça, informação fundamental para a expressão do comportamento agressivo (Lonstein e Gammie, 2002). Lesões citotóxicas ou eletrolíticas realizadas após o parto, do núcleo peripeduncular do mesencéfalo lateral também diminuíram o comportamento agressivo maternal, uma vez que este sítio neural se projeta para regiões do hipotálamo, para estruturas límbicas e para o mesencéfalo, que são necessários para o comportamento de agressão maternal (Factor et al., 1993; Hansen e Ferreira, 1986; Lonstein e Gammie, 2002).

Adicionalmente, lesões eletrolíticas da área ventrolateral caudal da matéria cinzenta periaquedutal, pré e pós-parto, diminuíram a latência de ratas lactantes para iniciarem o ataque aos intrusos e duplicaram o número de ataques, indicando que este sítio neural poderia estar tonicamente inibindo a agressão maternal (Lonstein e Stern, 1997). Lesões eletrolíticas da parte ventral do hipotálamo ventromedial, por sua vez, reduziram drasticamente as respostas agressivas

maternais, indicando um papel crítico desta região na expressão deste comportamento (Hansen, 1989). Por fim, lesões eletrolíticas extensas da região septal inibiram tanto as respostas agressivas, como o cuidado da prole (Flannelly et al., 1986).

De particular relevância na organização do comportamento maternal, a área pré-óptica medial, não foi avaliada na agressão maternal propriamente dita. Ratas não lactantes com lesão eletrolítica nesta área têm seus níveis de agressão diminuídos, enquanto fêmeas lactantes com lesão eletrolítica, apresentam o comportamento maternal prejudicado, dificultando a análise do comportamento agressivo (Gammie e Lonstein, 2005).

Como mencionado anteriormente, o reconhecimento do intruso como uma ameaça, parece ser um elemento fundamental para o desencadeamento do comportamento agressivo maternal. Dessa forma, cabe ressaltar que toda interação social que gera uma postura agressiva, depende do reconhecimento do adversário como uma ameaça potencial, um competidor sexual ou um intruso em seu território (Halpern e Martinez-Marcos, 2003). Para tanto, esse reconhecimento depende da detecção de pistas olfatórias percebidas pela via olfatória principal e/ou pelo sistema vomeronasal (Halpern e Martinez-Marcos, 2003).

A informação feromonal chega ao bulbo olfatório acessório à partir de uma projeção direta proveniente do órgão vomeronasal (Halpern e Martinez-Marcos, 2003) e é transmitida em grande parte para o núcleo medial da amígdala (Scalia e Winans, 1975). Através das projeções do núcleo medial da amígdala para estruturas que integram o circuito reprodutivo da zona medial do hipotálamo, como o núcleo pré-óptico medial, o núcleo ventromedial e o núcleo pré-mamilar ventral (PMv), a informação feromonal pode modular a organização dos comportamentos sexuais parentais e de interação social (Swanson, 2000).

No contexto da organização das respostas de interação social, como a agressão maternal, cabe ressaltar que o PMv é um importante sítio neural para a integração de informações feromonais, além de ser altamente sensível a hormônios sexuais (Canteras et al., 1992).

Segundo Canteras et al. (1992), o PMv projeta-se densamente para regiões relacionadas ao circuito sexualmente dimórfico como, a parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico e para regiões adjacentes do hipotálamo lateral, para o núcleo pré-óptico medial, para o núcleo periventricular anteroventral do

hipotálamo, para o núcleo principal da estria terminal, para a parte ventral do núcleo septal lateral, para região pósterodorsal do medial da amígdala e para o núcleo posterior da amígdala.

Desta forma, postulamos que o PMv, potencialmente sensível às pistas feromonais do macho intruso, poderia servir como uma possível interface entre a detecção feromonal e os sistemas envolvidos na expressão e no controle da agressão maternal.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo avaliar a participação do PMv e de seus alvos de projeção no comportamento agressivo maternal, para isso, avaliamos o padrão de ativação da proteína Fos do PMv, bem como de seus principais alvos de projeção, como a parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico, área hipotalâmica lateral tuberal, núcleo pré-optica medial, núcleo periventricular anteroventral do hipotálamo, núcleo principal da estria terminal, parte ventral do núcleo septal lateral, região postero-dorsal do núcleo medial da amígdala e núcleo posterior da amígdala, durante a expressão do comportamento maternal e da agressão maternal. Em seguida, avaliamos os efeitos de uma lesão citotóxica por NMDA bilateral do PMv sobre a expressão desses comportamentos. Por fim, com o objetivo de identificar o substrato neural responsável pelas alterações comportamentais observadas em fêmeas lactantes portadoras de lesão no PMv, avaliamos como a lesão poderia interferir na ativação de seus principais alvos de projeção durante a exposição a um macho intruso.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos (para o acasalamento) e fêmeas da linhagem *Long Evans*, ratos da linhagem *Wistar* (intruso), provenientes do Departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo (ICB - USP), com aproximadamente 90 dias de idade no início do experimento. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação animal do Departamento de Anatomia do ICB- USP e alojados em gaiolas de polipropileno medindo, 30x40x18 cm, em salas com sistema de ventilação (23 ± 2 °C) e ciclo de luz de 12 horas. Água e comida foram oferecidas *ad libitum* durante todos os experimentos, os quais foram conduzidos de acordo com o Comitê de ética em pesquisa adotado pela Universidade de São Paulo (protocolo nº 030.09-CEEA).

3.2 Acasalamento

Para o acasalamento as ratas permaneceram na gaiola dos machos durante dez dias consecutivos. Após este período, as ratas foram colocadas em gaiolas individuais e os partos foram acompanhados diariamente.

3.3 Lesão Citotóxica por NMDA

O PMv é uma região associada a comportamentos reprodutivos e lesões nessa área produzem um déficit no acasalamento, afetando o ciclo estral das fêmeas, que não conseguem ficar prenhas (Hill et al., 2008). Assim, os animais foram submetidos à lesão entre os dias 14 e 17 de prenhes (Lonstein e Stern, 1997). As fêmeas foram anestesiadas com uma injeção intraperitoneal de Pentobarbital de sódio (Cristália, Itapira, SP, Brasil) na proporção de 0,3 ml/100 g de peso corpóreo e em seguida foram posicionadas no aparelho estereotático, onde receberam um depósito iontoforético bilateral de uma solução de ácido-N-metil-D-aspartico (NMDA-Sigma) a 0,15 M centrado no PMv (-3,9 em relação ao bregma). Os depósitos foram feitos por meio de micropipetas de vidro com diâmetro interno da ponta da ordem de 40 µm, mediante aplicação de -15 µA de corrente pulsátil (7 s “on”, 7 s “off”) durante 10 minutos, proveniente de uma fonte de corrente constante.

3.4 Nascimento e Padronização da Ninhada

A ocorrência de nascimentos foi monitorada diariamente até as 12 h. Após este horário, os partos foram considerados como tendo ocorrido no dia seguinte, dia 0 de lactação. No dia 3 de lactação, as ninhadas foram padronizadas para 4 machos e 4 fêmeas.

3.5 Delineamento experimental

Para analisar o envolvimento do PMv no comportamento de agressão maternal, as ratas foram divididas em três grupos experimentais: a) Fêmeas lactantes sem lesão no PMv expostas ao macho intruso (Grupo Agressão Maternal/Intacto); b) Fêmeas com lesão no PMv expostas ao macho intruso (Grupo Lesão PMv); c) Fêmeas sem lesão no PMv que não foram expostas ao macho intruso, sendo analisado somente o comportamento maternal (Grupo Maternal).

Com o objetivo de avaliar se a lesão citotóxica por NMDA poderia interferir no comportamento maternal, todas as fêmeas dos grupos Agressão Maternal/Intacto e Lesão PMv foram observadas nos dias 1, 2, 3 e 4 de lactação no período claro do dia por 50 minutos, sendo realizadas 10 observações de 3 segundos com um intervalo de 5 minutos. Durante este período foram analisados parâmetros comportamentais como: permanência no ninho, contato com mais da metade da ninhada, limpeza ou amamentação da prole e parâmetros não maternais como, permanência da fêmea fora do ninho, comendo ou bebendo.

Os testes comportamentais para agressão maternal foram realizados nos dias cinco ou seis de lactação, na primeira hora do período escuro do dia. As ratas lactantes com lesão no PMv (Lesão PMv, n=5) e o grupo sem lesão (Agressão Maternal/Intacto, n=5) foram habituadas na sala de teste comportamental por 60 minutos, a partir da primeira hora do período escuro. Em seguida, um macho adulto da linhagem *Wistar* foi colocado na caixa experimental e as respostas comportamentais foram observadas por um período de 5 minutos. O encontro foi registrado por uma câmera filmadora para posterior análise comportamental, utilizando-se o programa "The observer" (Noldus). Como comportamentos agressivos foram avaliados as seguintes respostas comportamentais: *grooming* agressivo (investigação do focinho e das orelhas do macho com o nariz e a boca),

ataque (*jump-attack*- pular sobre o intruso, mordidas e pressionamento do intruso) e postura lateral. Como comportamentos não agressivos foram avaliados: cheirar o intruso (*sniffing*), exploração e auto-limpeza (*self-grooming*). As fêmeas do grupo Maternal (n=5) também foram habituadas na sala de teste comportamental por 60 minutos. Após este período foi observado por 5 minutos somente o comportamento maternal, sem a presença do macho intruso.

Figura 1- Delineamento experimental desde o acasalamento até o teste comportamental das ratas lactantes dos grupos Agressão Maternal/Intacto e Maternal.

Figura 2- Delineamento experimental desde o acasalamento até o teste comportamental das ratas lactantes do grupo Lesão PMv.

3.6 Perfusão e Histologia

Noventa minutos após o teste comportamental, as fêmeas foram anestesiadas por via intraperitoneal com Ketamina 5% e Xilazina 2% (0,4 ml / 100 g de peso corpóreo) e em seguida perfundidas por via trans-aórtica, utilizando uma bomba peristáltica (Cole Parmer), com 150 ml de solução de Salina 0,9% e, em seguida, com 1000 ml de Paraformaldeído a 4% diluído em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4). As ratas foram mantidas sob refrigeração por 3 horas e, após esse período, o encéfalo foi retirado da caixa craniana e mantido em solução de sacarose 20% em tampão fosfato de potássio 0,02M, por aproximadamente 12 horas para crioproteção.

A seguir, cortes frontais semi-seriados, com 40 μ m de espessura, foram obtidos utilizando-se um micrótomo de congelação (Carl Zeiss®, Alemanha). Os cortes foram colhidos sequencialmente e armazenados em cinco séries, uma série foi utilizada para reação de imunoistoquímica para detecção da proteína Fos e a série adjacente foi corada pelo método de Nissl, com tionina 0,25%, como referência citoarquitetônica. O material histológico obtido foi analisado em microscópio óptico Nikon Eclipse 80i com campo claro.

3.7 Reação imunoistoquímica para detecção da proteína Fos

A detecção imunoistoquímica da proteína Fos tem se revelado um método bastante valioso para analisarmos as populações neurais particularmente mobilizadas frente a uma dada condição comportamental (Morgan e Curran, 1991).

No processamento imunoistoquímico para detecção da proteína Fos, os cortes foram incubados inicialmente em uma solução de tampão fosfato de potássio 0,02 M contendo triton X-100 a 0,3%, soro normal de cabra a 2% e anticorpo primário anti-Fos obtido em coelho (Ab-5/Oncogene Research Products) numa diluição de 1:20.000, sob agitação constante, a 4 °C, durante 72 horas. Para localização do complexo antígeno-anticorpo os cortes foram incubados por 90 minutos no anticorpo secundário biotinilado feito em cabra (Biotinylated anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories) na diluição 1:200. O anticorpo secundário biotinilado foi visualizado usando-se o complexo biotina-avidina-peroxidase numa diluição de 1:200 (ABC Elite Kit, Vector Laboratories). Para revelarmos a peroxidase ligada ao

complexo biotina-avidina utilizamos a técnica da glicose oxidase descrito por Itoh et al. (1979), assim, após lavagens sucessivas, os cortes foram incubados em uma solução contendo 50 mg de tetrahydroclorato de 3-3'diaminobenzidina (DAB), 0,6mg de glicose oxidase, 40 mg de cloreto de amônio e 2 ml de solução aquosa de sulfato de níquel a 10% em 100 ml de tampão fosfato de sódio 0,1M por 5 minutos. Em seguida foi adicionado β -D-glicose e a reação enzimática foi interrompida após um período de tempo variável, em geral em torno de 15 minutos. Após a reação de imunoistoquímica, os cortes foram montados em lâminas recobertas com gelatina e em seguida, os cortes foram desidratados e recobertos com DPX (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA)

3.8 Quantificação de células Fos positivas

A contagem do número células imunorreativas para a proteína Fos foi realizada nos três grupos experimentais (Maternal, Agressão Maternal/Intacto, e Lesão PMv). As imagens geradas das regiões encefálicas escolhidas foram feitas utilizando a objetiva de 10X de um microscópio Nikon Eclipse 80i equipado com uma câmera digital Nikon DXM 1200F. Para a quantificação das células, inicialmente selecionamos o corte, delineamos os núcleos de interesse com base na série corada pelo método de Nissl, de tal forma que as células imunorreativas para proteína Fos foram contadas na área delimitada. A densidade de células marcadas foi determinada dividindo o número de células imunorreativas para proteína Fos pela área da região de interesse. Tanto a contagem de células quanto a medida da área foram feitos através do programa Image-Pro Plus.

As figuras foram editadas utilizando os programas Photoshop 7.0 (Adobe Photoshop) e Illustrator 6.0 (Adobe Illustrator), sendo que apenas o brilho, contraste e equilíbrio de cores foram ajustados.

3.9 Análise Estatística

Para a análise estatística, foi utilizada o teste U de Mann-Whitney, do programa Prism versão 2.0. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão, considerando-se significante sempre que $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Inicialmente avaliamos a participação do PMv e de seus alvos de projeção como, a parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico, área hipotalâmica lateral tuberal, núcleo pré-óptico medial, núcleo periventricular anteroventral do hipotálamo, núcleo principal da estria terminal, parte ventral do núcleo septal lateral, região pósterodorsal do núcleo medial da amígdala e núcleo posterior da amígdala na expressão do comportamento maternal e agressão maternal. A análise dos resultados mostrou que as fêmeas lactantes expostas ao macho intruso apresentaram um aumento significativo da densidade de células Fos positivas no PMv (Figura 1), na parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico, na área hipotalâmica lateral tuberal, na região pósterodorsal do núcleo medial da amígdala, no núcleo pré-óptico medial e no núcleo posterior da amígdala (Tabela 1, Figuras 2 e 3). Notamos ainda, que outros alvos do PMv, como o núcleo periventricular anteroventral, a parte ventral do núcleo septal lateral e o núcleo principal da estria terminal, não apresentam diferença significativa quanto a densidade de células Fos positivas entre as ratas lactantes que expressaram o comportamento maternal e aquelas que apresentaram a agressão maternal (Tabela 2, Figura 3).

Figura 3- Fotomicrografia em campo claro de corte frontal de encéfalo de rata lactante exposta a um macho intruso (A) e fêmea lactante sem o encontro com o intruso (B), ao nível da região pré- mamilar do hipotálamo. Cortes imunorreagidos para a proteína Fos. Abreviaturas: IIIV- terceiro ventrículo; PMv- núcleo pré-mamilar ventral.

Tabela 1 - Densidade de células imunorreativas à proteína Fos (nº de células/mm²) do núcleo pré-mamilar ventral (PMv); da parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico (VMHvl); da área hipotalâmica lateral tuberal (LHA_{tu}); da região pósterio-dorsal do núcleo medial da amígdala (MEA_{pd}); do núcleo periventricular anteroventral (AVPV); do núcleo principal da estria terminal (BST_{pr}); da parte ventral do núcleo septal lateral (LSv); do núcleo pré-optico medial (MPN) e do núcleo posterior da amígdala (PA), de fêmeas lactantes no comportamento maternal (Maternal) e de ratas lactantes sem lesão expostas ao macho intruso (Agressão Maternal). Os valores são expressos em média ± erro padrão. ***p* = 0,0079. Teste U Mann-Whitney.

	Maternal (n=5): Densidade (nº céls Fos positivas/ mm²)	Agressão Maternal (n=5): Densidade (nº céls Fos positivas/ mm²)	Valor de <i>p</i>
PMv	13.90 ± 2,89	845,9 ± 132,4	0,0079**
VMHvl	33.13 ± 8.83	631,6 ± 98,13	0,0079**
LHA_{tu}	54,22 ± 13.18	333,9 ± 32,53	0,0079**
MEA_{pd}	34,24 ± 10,22	234,2 ± 44,20	0,0079**
AVPV	59,14 ± 10,98	81,11 ± 13,88	0,2222
BST_{pr}	127,1 ± 11,57	158,4 ± 35,02	0,1508
LSv	89,67 ± 26,59	143,2 ± 23,41	0,3095
MPN	516,3 ± 51,76	746,1 ± 44.33	0,0079**
PA	22,06 ± 5,33	265,9 ± 21,02	0,0079**

Figura 4- Densidade de células imunorreativas à proteína Fos (nº de células/mm²) do (A) núcleo pré-mamilar ventral (PMv); (B) parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico (VMHvl); (C) área hipotalâmica lateral tuberal (LHAtu); (D) região postero-dorsal do núcleo medial da amígdala (MEApd); (E) núcleo posterior da amígdala (PA) e (F) núcleo pré-optico medial (MPN) na expressão do comportamento maternal (Maternal; n=5) e na agressão maternal (Agressão Maternal; n=5). Dados expressos em média ± erro padrão. ***p* = 0,0079. Teste de U Mann-Whitney.

Figura 5- Densidade de células imunorreativas à proteína Fos (nº de células/mm²) da (A) parte ventral do núcleo septal lateral (LSv); (B) do núcleo principal da estria terminal (BSTpr) e (C) do núcleo periventricular anteroventral do hipotálamo (AVPV) na expressão do comportamento maternal (Maternal; n=5) e na agressão maternal (Agressão Maternal; n=5). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. Teste de U Mann-Whitney.

Em um segundo momento, avaliamos o papel funcional do PMv na expressão do comportamento agressivo maternal, a partir de lesões neuroquímicas por NMDA (Figura 4), em fêmeas prenhas expostas ao macho intruso.

A observação das respostas maternas nos primeiros dias de lactação, que antecederam a exposição das fêmeas com lesão do PMv ao macho intruso, mostrou que não houve alteração na frequência dos cuidados com a prole (Figura 5), indicando que a expressão do comportamento maternal não foi afetada.

Por outro lado, quando expostos ao macho intruso, estes animais apresentaram um déficit acentuado das respostas agressivas maternas, caracterizado por um aumento significativo na latência para o primeiro ataque ($**p=0,0025$ - Tabela 1, Figura 6) e uma diminuição no número e na duração dos ataques ($***p<0,0001$ - Tabela 2; Figura 6), bem como na postura lateral ($***p=0,0003$ - Tabela 2, Figura 7). Além disso, as fêmeas com lesão do PMv apresentaram um aumento na resposta de cheirar o intruso (*sniffing*; $**p=0,0079$). Outros parâmetros como exploração, *self-grooming* (auto-limpeza) e permanência no ninho, parada ou andando pela caixa experimental, não sofreram alterações (Tabela 2, Figura 8).

Figura 6- Fotomicrografia em campo claro de corte frontal de encéfalo de rata lactante corado pelo método de Nissl caracterizada por perda celular e gliose (demarcada pelas setas); corte imunorreagido para NeuN, ilustrando a extensão da lesão bilateral do núcleo pré-mamilar ventral

Figura 7- Parâmetros do comportamento maternal observados nos primeiros dias de lactação em ratas de ratas sem lesão do PMv (Intacto; n=5) e de fêmeas com lesão do PMv (Lesão PMv; n=5). **(A)** Frequência em que a rata permaneceu amamentando os filhotes, **(B)** frequência que a rata permaneceu com mais da metade da ninhada, **(C)** frequência que a rata permaneceu no ninho, **(D)** frequência que a rata fez *grooming* nos filhotes e **(E)** frequência que a rata apresentou comportamentos não maternos. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. Teste U Mann-Whitney.

Figura 8- Avaliação da resposta de ataque de ratas lactantes sem lesão do PMv (Intacto; n=5) e ratas com lesão do PMv (Lesão PMv; n=5) expostas ao macho intruso. **(A)** Latência (s) para o primeiro ataque, **(B)** frequência dada pelo número de vezes em que as ratas apresentaram a resposta de ataque durante os 5 minutos de teste, **(C)** duração do tempo total em que as ratas expressaram o ataque. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. *** $p < 0,0001$; ** $p = 0,0025$. Teste U Mann-Whitney.

Figura 9- Avaliação de outros comportamentos agressivos de ratas lactantes sem lesão do PMv (Intacto; n=5) e ratas lactantes com lesão no PMv (Lesão PMv; n=5) expostas ao macho intruso. **(A)** Tempo total em que as fêmeas apresentaram a postura lateral durante os 5 minutos de teste, **(B)** frequência dada pela média do número total de vezes em que as ratas apresentaram o *grooming* agressivo. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. *** $p=0,0003$. Teste U Mann-Whitney.

Figura 10- Avaliação dos comportamentos não agressivos de ratas lactantes sem lesão do PMv (Intacto; n=5) e ratas lactantes com lesão no PMv (Lesão PMv; n=5) expostas ao macho intruso. Tempo total em que as fêmeas apresentaram *sniffing* (A), exploração (B), *self-grooming* (C) e outros comportamentos (D). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. ** $p=0,0079$. Teste U Mann-Whitney.

Tabela 2- Análise dos comportamentos agressivos e não agressivos de ratas lactantes intactas e ratas lactantes com lesão do PMv, expostas ao macho intruso. Dados expressos em média $\pm$ erro. *** $p < 0,0003$; ** $p < 0,008$. Teste de U Mann-Whitney.

Parâmetros Comportamentais	Grupo Intacto (n=5)	Grupo Lesão PMv (n=5)	Valor de p
<i>Comportamentos agressivos</i>			
Latência para o 1º ataque	64,79 $\pm$ 9,17	162,1 $\pm$ 26,22	0,0025**
Resposta de ataque em 5 minutos	8,88 $\pm$ 1,06	1,62 $\pm$ 0,41	0,0001***
Duração do ataque	46,22 $\pm$ 7,58	3,97 $\pm$ 1,04	0,0001***
<i>Grooming</i> agressivo	3,22 $\pm$ 0,86	1,75 $\pm$ 0,77	0,2766
Postura lateral	25,77 $\pm$ 3,67	2,41 $\pm$ 1,52	0,0003***
Exploração	31,41 $\pm$ 10,75	60,56 $\pm$ 14,30	0,0745
<i>Self-grooming</i>	18,06 $\pm$ 3,79	25,41 $\pm$ 7,89	0,67
<i>Sniffing</i>	56,79 $\pm$ 5,29	101,1 $\pm$ 12,86	0,0079**
Outros comportamentos	113,3 $\pm$ 11,71	102,2 $\pm$ 21,4	0,67

Por fim, analisamos o padrão de ativação dos principais sítios de projeção do PMv em ratas lactantes com lesão neuroquímica por NMDA após o encontro com o macho intruso. Verificamos uma diminuição significativa da densidade de células imunorreativas à proteína Fos na parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico, na área hipotalâmica lateral tuberal (Figura 11) e no núcleo pré-óptico medial (Tabela 3, Figuras 9 e 10). O mesmo não foi observado no núcleo periventricular anteroventral do hipotálamo, na região pósterodorsal do núcleo medial da amígdala, no núcleo principal da estria terminal, na parte ventral do núcleo septal lateral e no núcleo posterior da amígdala. (Tabela 3, Figura 10).

Figura 11- Densidade de células imunorreativas à proteína Fos (nº de células/mm²) da **(A)** área hipotalâmica lateral tuberal (LHA tu); **(B)** parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico (VMHvl); **(C)** região postero-dorsal do núcleo medial da amígdala (MEApd) e **(D)** núcleo pré-optico medial (MPN) de ratas lactantes sem lesão do PMv (Intacto; n=5) e ratas lactantes com lesão do PMv (Lesão PMv; n=5), expostas ao macho intruso. Dados expressos em média ± erro padrão. ***p* = 0,0079; **p* = 0,0159. Teste U Mann-Whitney.

Figura 12- Densidade de células imunorreativas à proteína Fos (nº de células/mm²) do (A) núcleo periventricular anteroventral do hipotálamo (AVPV); (B) núcleo principal da estria terminal (BSTpr); (C) parte ventral do núcleo septal lateral (LSv) e (D) núcleo posterior da amígdala (PA) de ratas lactantes sem lesão do PMv (Intacto; n=5) e ratas lactantes com lesão do PMv (Lesão PMv; n=5), expostas ao macho intruso. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. Teste U Mann-Whitney.

Tabela 3- Densidade de células imunorreativas à proteína Fos (nº de células/mm²) da parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico (VMHvl); da área hipotalâmica lateral tuberal (LHA_{tu}); da região postero-dorsal do núcleo medial da amígdala (MEA_{pd}); do núcleo periventricular anteroventral do hipotálamo (AVPV); do núcleo principal da estria terminal (BST_{pr}); da parte ventral do núcleo septal lateral (LSv); do núcleo pré-optico medial (MPN) e do núcleo posterior da amígdala (PA) de ratas lactantes sem lesão do PMv (Intacto; n=5) e ratas lactantes com lesão do PMv (Lesão PMv; n=5), expostas ao macho intruso. Dados expressos em média ± erro padrão. ***p* < 0,0079; **p* = 0,0159. Teste U Mann-Whitney.

	Intacto (n=5): Densidade (nº céls Fos positivas/ mm²)	Lesão PMv (n=5): Densidade (nº céls Fos positivas/ mm²)	Valor de <i>p</i>
VMHvl	631,6 ± 98,13	181,4 ± 55,59	0,0159*
LHA_{tu}	333,9 ± 32,53	117,3 ± 30,25	0,0079**
MEA_{pd}	234,2 ± 44,20	160,8 ± 20,09	0,4206
AVPV	81,11 ± 13,88	80,99 ± 13,56	0,8413
BST_{pr}	218,4 ± 32,44	189,7 ± 25,33	0,5476
LSv	143,2 ± 23,41	140,9 ± 29,68	1,0000
MPN	746,1 ± 44,33	254,0 ± 28,44	0,0079**
PA	265,9 ± 21,02	204,1 ± 20,20	0,0556

Figura 13- Fotomicrografia em campo claro de corte frontal de encéfalo de rata lactante, ilustrando a imunorreatividade à proteína Fos na região tuberal de fêmeas sem lesão e com lesão do PMv. Notar nas ratas lactantes com lesão do PMv uma grande redução do número de células Fos-positivas na região da parte lateral do núcleo ventromedial (VMHvl) e na região adjacente do hipotálamo lateral tuberal (LHA tu).

5 DISCUSSÃO

Em fêmeas lactantes, o comportamento agressivo maternal é fundamental para proteção da sua prole de infanticídio por um co-específico não parental, como um macho intruso (Agrell et al., 1998). Enquanto os circuitos neurais do comportamento maternal tem sido o foco de inúmeros estudos, poucos trabalhos focam no circuito neural do comportamento de agressão maternal (Hasen e Gammie, 2005). Dessa forma, consideramos relevante, avaliarmos o papel do PMv na organização do comportamento agressivo maternal, uma vez que este sítio neural parece integrar as pistas feromonais do macho intruso que é importante no reconhecimento da ameaça potencial para sua prole.

Na análise dos resultados, notamos que as fêmeas que expressaram o comportamento de agressão maternal, apresentam um aumento significativo das células Fos positivas no PMv, bem como em diversos de seus alvos, como por exemplo, a parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico, a área hipotalâmica lateral tuberal, a região póstero-dorsal do núcleo medial da amígdala, o núcleo pré-óptico medial e o núcleo posterior da amígdala. Indicando possíveis regiões que estariam envolvidas no comportamento agressivo maternal.

Os resultados comportamentais de fêmeas com lesão citotóxica bilateral do PMv mostraram que, quando expostas ao macho intruso, as ratas têm seus níveis de agressão diminuídos. Notamos nestas fêmeas um aumento na latência para o primeiro ataque, uma diminuição no número e na duração dos ataques, bem como na incidência das posturas laterais. Curiosamente, as ratas com lesão citotóxica bilateral do PMv apresentam um aumento do comportamento de cheirar o intruso (sniffing). Desta forma, sugerimos que o PMv possa modular o grau de agressão maternal e que a lesão deste núcleo leva a uma clara diminuição da agressão maternal.

O comportamento de sniffing, que ocorre antes do ataque, é essencial para o reconhecimento do macho intruso (Kolunie e Stern, 1990), que ocorre não somente por causa da estimulação olfatória, mas também pela estimulação do nervo trigêmeo devido à deflecção das vibrissas (Gammie e Lonstein, 2006). O aumento da expressão desse comportamento em fêmeas com lesão no PMv possivelmente indica um déficit no reconhecimento das pistas feromonais do macho intruso.

Importante mencionar que, fêmeas lactantes com lesão citotóxica bilateral do PMv se comportam normalmente frente à prole. Segundo Slamberová et. al. (2001),

os parâmetros comportamentais que caracterizam o comportamento maternal são mais intensos durante o período claro e estão presentes, principalmente, na primeira semana de lactação; dias e período em que foi realizada a observação desse comportamento em todas as ratas.

A análise do padrão de ativação dos alvos do PMv nas fêmeas com lesão bilateral do PMv mostrou que vários de seus alvos (i.e., região póstero-dorsal do núcleo medial da amígdala, núcleo posterior da amígdala, núcleo principal da estria terminal, parte ventral do núcleo septal lateral e núcleo periventricular anteroventral do hipotálamo) não apresentam uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais. Outros alvos do PMv, como a parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico, a área hipotalâmica lateral tuberal e o núcleo pré-óptico medial apresentam uma diminuição da densidade de células Fos positivas quando comparadas com fêmeas sem lesão do PMv.

Como dito anteriormente, no comportamento social de roedores, a informação olfatória é essencial (Cooke e Woolley, 2005). Ratos machos e fêmeas utilizam pistas olfativas em situações diferentes; os machos usam essas pistas para responder às fêmeas receptivas e para competir pela dominância territorial (Bergvall et al., 1991) e as fêmeas, dependem das pistas olfativas para a manutenção do comportamento maternal (Aron, 1979) e para o reconhecimento do macho intruso como uma ameaça potencial para sua prole.

O núcleo medial da amígdala tem um papel fundamental no comportamento social de roedores. Este núcleo integra sinais olfatórios feromonais, oriundos do bulbo olfatório acessório (Scalia e Winans, 1975). Trabalhos mostram que lesões no núcleo medial da amígdala produzem déficits no acasalamento, no comportamento parental e no reconhecimento social (Harris e Sachs, 1975; Ferguson et al., 2001; Sheehan et al., 2001). Aqui é importante ressaltar que a região póstero-dorsal do núcleo medial da amígdala se projeta densamente para o núcleo principal da estria terminal, que também tem sido associado ao processamento de informações olfativas essenciais para a identificação do co-específico e para respostas sociais adequadas em ratos, hamsters e camundongos (Newman, 1999).

Notamos ainda que durante a agressão maternal há a mobilização do núcleo posterior da amígdala e que esta ativação não se altera nas fêmeas com lesão citotóxica bilateral do PMv. Conforme pudemos aferir na literatura, esta é a primeira observação do núcleo posterior da amígdala mobilizado na expressão agressão

maternal. Interessantemente, este núcleo expressa altos níveis de receptores de mineralocorticóides (ver Canteras et al., 1992), e sabidamente os corticóides exógenos influenciam a agressão maternal (Haller et al., 1998). Este sítio neural, por sua vez, se projeta densamente para estruturas hipotalâmicas envolvidas na expressão do comportamento agressivo maternal, como a parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico e a parte tuberal do hipotálamo lateral (Canteras et al., 1992), conforme discutiremos a seguir. Com isso, a ativação do núcleo posterior da amígdala nas ratas lactantes expostas a um macho intruso sugere uma via neural na qual os mineralocorticóides atuam sobre o comportamento de agressão maternal. Como a ativação desta via aparentemente não se altera com a lesão citotóxica bilateral do PMv, sugerimos que o núcleo posterior da amígdala deva ser particularmente influenciado pela mediação dos mineralocorticóides.

Importante ressaltar que a interação entre a fêmea e os filhotes é um dos fatores determinantes no desencadeamento do comportamento maternal. Ratas e camundongas fêmeas virgens podem apresentar este comportamento após vários dias de contato com os filhotes (Stack e Numan, 2000). A interação entre diversos hormônios importantes para a regulação do comportamento maternal influencia vários sítios neurais críticos para a expressão deste comportamento. Uma região importante é o núcleo pré-óptico medial, que com a ação do estrogênio, é crítico para o surgimento de comportamentos maternos logo após o parto (Wagner e Morrell, 1996). Estudos com lesões nesta área mostraram um aumento da latência para o início do comportamento maternal (Gray e Brooks, 1984; Jacobson et al., 1980; Numan et al., 1977). Além disso, implante de estradiol no núcleo pré-óptico medial de ratas virgens diminuiu a latência para o início deste comportamento (Fahrbach e Pfaff, 1986; Numan et al., 1977). Fêmeas com lesão citotóxica bilateral do PMv apresentam cuidado com a prole normal quando testadas durante o comportamento maternal. Notamos, por outro lado, que a ativação do núcleo pré-óptico medial também aumenta durante a agressão maternal e este aumento é prejudicado em fêmeas portadoras de lesão bilateral do PMv. Esta maior ativação do núcleo pré-óptico medial pode estar associada ao fato de que as fêmeas aumentam o cuidado com a prole durante a agressão maternal, exacerbando os comportamentos de proteção dos filhotes, como pudemos observar em outros experimentos em nosso laboratório. Desta forma, especulamos que o aumento da mobilização desta região

na expressão do comportamento agressivo maternal possa estar sendo mediado, pelo menos em parte, pelo PMv.

Ratas com lesão citotóxica bilateral do PMv, quando expostas ao macho intruso, apresentaram uma grande diminuição do grau de ativação de células imunorreativas a proteína Fos na parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico e na área hipotalâmica lateral tuberal. Essas duas regiões fazem parte de uma região hipotalâmica relacionada com o comportamento de agressão, conhecida como área hipotalâmica de ataque (Roeling et al., 1994). De acordo com Roberts e Nagel (1996), o hipotálamo ventromedial e suas projeções para a área peripeduncular, foram consideradas importantes para a expressão do comportamento agressivo. Lesões eletrolíticas ou com ácido ibotênico da parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico e adjacências diminuíram severamente o comportamento agressivo maternal (Hansen, 1989; Hansen e Ferreira, 1986). Corroborando estes dados, estudos de nosso laboratório, começam a mostrar que lesões citotóxicas bilaterais centradas na parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico e na área hipotalâmica lateral tuberal praticamente abolem o comportamento de agressão maternal. Curiosamente, os animais com lesões nestas áreas, expressam maiores cuidados de proteção da prole quando expostas ao macho intruso.

Em resumo, nossos resultados sugerem um importante papel do PMv na expressão do comportamento agressivo maternal, por integrar informações olfativas provenientes do macho intruso e por modular de uma forma direta a parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico e a área hipotalâmica lateral tuberal, setores hipotalâmicos aparentemente críticos para a expressão do comportamento de agressão maternal.

6 CONCLUSÃO

Os resultados referentes ao padrão de ativação do PMv, bem como de seus principais alvos de projeção, durante a expressão do comportamento agressivo maternal, aliados as alterações comportamentais decorrentes da lesão neuroquímica por NMDA, apontam para um importante papel deste sítio neural na modulação da agressão maternal, possivelmente através da integração das pistas feromonais provenientes do intruso. Além disso, a diminuição da ativação da parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico e da área hipotalâmica lateral tuberal em ratas lactantes com lesão bilateral por NMDA do PMv e não de outros alvos de projeção, sugere que o papel do PMv sobre a resposta agressiva maternal possa ser mediado através destes dois sítios neurais, que seriam os elementos hipotalâmicos críticos para a expressão do comportamento de agressão maternal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

Agrell J, Wolff JO, Ylonen H. Counter-strategies to infanticide in mammals: Costs and consequences. *Oikos*. 1998;83(3):507-17.

Archer J. The behavioural biology of Aggression. Preston: Cambridge University Press; 1988.

Aron C. Mechanisms of control of the reproductive function by olfactory stimuli in female mammals. *Physiol Rev*. 1979;59(2):229-84.

Bergvall AH, Vega JM, Dahlof LG, Hansen S. Peripheral anosmia attenuates female-enhanced aggression in male rats. *Physiol Behav*. 1991;50(1):33-40.

Blanchard RJ, Blanchard DC. The organization and modeling of animal aggression. In: Brain PF, Benton O, editors. *The Biology of Aggression*, Alphen an den Rijn. The Netherlands: Sijthoff & Noordhoff; 1981. p. 529-61.

Blanchard DC, Blanchard RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology*. 1988;39:43-68.

Blanchard RJ, Blanchard DC. Anti-predator defensive behaviors in visible burrow system. *Journal of Comparative Psychology*. 1989;103(1):70-82.

Blanchard D C, Fukunaga-Stinson C, Takahashi LK, Flannelly KJ, Blanchard RJ. Dominance and aggression in social groups of male and female rats. *Behavioural Processes*. 1984;9:31-48.

Blanchard DC, Blanchard RJ, Torn P, Rodgers RJ. Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. *Psychopharmacology*. 1990;101(4):511-18.

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Projections of the Ventral Premammillary Nucleus. *The Journal of Comp. Neurol*. 1992;324(2):195-212.

Cooke BM, Woolley CS. Sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *Journal of Neuroscience*. 2005; 25(46):10759-67.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Crawford S, Balon EK. Cause and effect of parental care in fishes: An epigenetic perspective. In: Rosenblatt J, Snowdon CT, editors. Parental care: Evolution, mechanisms, and adaptive significance. New York: Academic Press; 1996. Vol. 25, p. 53-108.

Factor EM, Mayer AD, Rosenblatt JS. Peripeduncular nucleus lesions in the rat: Effects on maternal aggression, lactation, and maternal behavior during pre-and postpartum periods. Behavioral Neuroscience. 1993;107(1):166-85.

Fahrbach SE, Pfaff DW. Effects of preoptic area implants of dilute estradiol on the maternal behavior of ovariectomized, nulli-parous rats. Horm Behav. 1986; 20(3):354-63.

Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. Journal of Neuroscience. 2001;21(20) 8278-85.

Ferreira A, Dahlof LG, Hansen S. Olfactory mechanisms in the control of maternal aggression, appetite, and fearfulness: Effects of lesions to olfactory receptors, mediodorsal thalamic nucleus, and insular prefrontal cortex. Behavioral Neuroscience. 1987;101(5):709- 717.

Flannelly KJ, Flannelly L. Time course of postpartum aggression in rats (*Rattus norvegicus*). Journal of Comparative Psychology. 1987;101(4):101-3.

Flannelly KJ, Kemble ED, Blanchard DC, Blanchard RJ. Effects of septal- forebrain lesions on maternal aggression and maternal care. Behavioral and Neural Biology, 1986;45(1):17-30

Gammie SC. Current models and future directions for understanding the neural circuitries of maternal behaviors in rodents. Behav Cong Neurosci Rev. 2005;4(2):119-35.

Gammie SC, Lonstein JS. Maternal aggression. In: Randy N, editor. Biology of aggression. Oxford: Oxford University Press; 2006. p. 250-74.

Gray P, Brooks PJ. Effect of lesion location within the medial preoptic-anterior hypothalamic continuum on maternal and male sexual behaviors in female rats. Behavioral Neuroscience. 1984;98(4):703-11.

Haller J, Millar S, Kruk MR. Mineralocorticoid receptor blockade inhibits aggressive behaviour in male rats. *Stress*. 1998;2(3):201-7.

Halpern M, Martinez-Marcos A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol*. 2003;70(3):245-318.

Haney M, DeBold JF, Miczek KA. Maternal aggression in mice and rats toward male and female conspecifics. *Aggressive Behavior*. 1989;15(3):443-53.

Hansen S, Ferreira A. Food intake, aggression, and fear behavior in the mother rats: control by neural systems concerned with milk ejection and maternal behavior. *Behavioral Neuroscience*. 1986;100(1):64-70.

Hansen S. Medial Hypothalamic involvement in maternal aggression of rats. *Behavioral Neuroscience*. 1989;103(5):1035-46.

Harris VS, Sachs BD. Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions. *Brain Res*. 1975; 86(3):514-18.

Hasen NS, Gammie SC. Differential fos activation in virgin and lactating mice in response to an intruder. *Physiol. Behav*. 2005;84(5):681–95.

Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294(5):827-32.

Huntingford FA. Animals fight, but do not make war. In: Groebel J, Hinde RA, editors. *Aggression and War- Their biological and social bases*. Cambridge: Cambridge University Press; 1989. Vol. 1, p. 25-34.

Itoh K, Konishi A, Nomura S, Mizuno N, Nakamura Y, Suguimoto T. Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of the horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. *Brain Research*. 1979;175(2):341-6.

Jacobson CD, Terkel J, Gorski RA., Sawyer CH. Effects of small medial preoptic area lesions on maternal behavior: Retrieving and nest building in the rat. *Brain Res*. 1980;194(2):471-8.

Kolonie JM, Stern JM. Maternal aggression: Disruption by perioral anesthesia in lactating Long Evans rats (*Rattus norvegicus*). Journal of Comparative Psychology. 1990; 104(4):352-60.

Ledesma J, de Luis JM, Montejo AL, Llorca G, Perez-Urdaniz A. Maternal aggression in human beings. New Trends in Experimental and Clinical Psychiatry. 1988;49(2): 223-8.

Leyhausen P. On the functions of the relative hierarchy of moods. In: Lorenz K, Leyhausen P, editors. Motivation of Human and Animal Behavior: An Ethological View. New York: Van Nostrand; 1973. p.144-247.

Lonstein JS, Gammie SC. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. Neurosci. and Behav. Reviews. 2002;26(8):869-88.

Lonstein JS, Stern JM. Role of the midbrain periaqueductal gray in maternal nurturance and aggression: c-Fos and electrolytic lesion studies in lactating rats. Journal of Neuroscience. 1997;17(9):3364-78.

Mann MA, Konen C, Svare B. The role of progesterone in pregnancy-induced aggression in mice. Horm Behav. 1984;18(2):140-60.

Mos J, Olivier B, van Oorschot R, van Aken H, Zethof T. Experimental and ethological aspects of maternal aggression in rats: five years of observations. In: Blanchard RJ, Brain PF, Blanchard DC, Parmigian S, editors. Ethoexperimental Approaches to the Study of Behavior. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1989. Vol. 26, p. 385-98.

Newman SW. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. Ann NY Acad Sci. 1999;877:242-57.

Numan M, Rosenblatt JS, Komisaruk BR. Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. J Comp Physiol. 1977;91(1):146-64.

Numan M. Maternal Behavior. In: Knobil E, Neill JD. The Physiology of Reproduction, New York: Raven Press; 1994. Vol. 1, p. 221-300.

Parmigian S, Brain PF, Mainardi D, Brunoni V. Different patterns of biting attack employed by lactating female mice (*Mus domesticus*) in encounters with male and female conspecific intruders. Journal Comparative Psychology. 1988;102(3):287-93.

Roberts WW, Nage J. First-order projections activated by stimulation of hypothalamic sites eliciting attack and flight in rats. *Behavioral Neuroscience*. 1996;110(3):509-27.

Roeling TA, Veening JG, Kruk MR, PetersJP, Vermelis ME, Nieuwenhuys R. Efferent connections of the hypothalamic “aggression area” in the rat. *Neuroscience*. 1994;59(4):1001-24.

Scalia F, Winans SS. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol*. 1975;161(1):31-55.

Sheehan T, Paul M, Amaral E, Numan MJ, Numan M. Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats. *Neuroscience*. 2001;106(2):341-56.

Slamberová R, Szilágyi B, Vathy I. Repeated morphine administration during pregnancy attenuates maternal behavior. *Psychoneuroendocrinology*. 2001;26(6):565-76.

Stack EC, Numan M. The temporal course of expression of c-fos and Fos B within the medial preoptic area and other brain regions of postpartum female rats during prolonged mother-young interactions. *Behavioral Neuroscience*. 2000;114(3):609-22.

Stern JM, McDonald C. Ovarian hormone-induced short-latency maternal behavior in ovariectomized virgin Long-Evans rats. *Horm Behav*. 1989;23(2):157-72.

Swanson LW. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res*. 2000;886:113-64.

Van den Berg MJ, Ter Horst, Koolhaas JM. The nucleus premammillaris ventralis (PMv) and aggressive behavior in the rat. *Aggress. Behav*. 1983;9(2):41-7.

Wagner KC, Morrell JI. Levels of estrogen receptor immunoreactivity are altered in behaviorally-relevant brain regions in female rats during pregnancy. *Molecular Brain Research*. 1996;42(2):328–36.