ISADORA CLIVATTI FURIGO

**PAPEL DO HIPOTÁLAMO VENTROMEDIAL E DA PARTE TUBERAL
DO HIPOTÁLAMO LATERAL NO COMPORTAMENTO DE
AGRESSÃO MATERNAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

ISADORA CLIVATTI FURIGO

**PAPEL DO HIPOTÁLAMO VENTROMEDIAL E DA PARTE TUBERAL
DO HIPOTÁLAMO LATERAL NO COMPORTAMENTO DE
AGRESSÃO MATERNA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Ciências Morfofuncionais do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências
Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Newton Sabino
Canteras

Versão original

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Furigo, Isadora Clivatti.

Papel do hipotálamo ventromedial e parte tuberal do hipotálamo lateral no comportamento de agressão maternal / Isadora Clivatti Furigo. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. 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 ventromedial hypothalamus and tuberal part of the lateral hypothalamus in maternal behavior aggression.

1. Agressividade 2. Comportamento materno animal 3. Hipotálamo
I. Canteras, Prof. Dr. Newton Sabino II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB090/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Isadora Clivatti Furigo.

Título da Dissertação: Papel do hipotálamo ventromedial e parte tuberal do hipotálamo lateral no comportamento de agressão maternal.

Orientador(a): Prof. Dr. Newton Sabino Canteras.

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

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>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</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p>
---	--

Decl. CEEA.051.09

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 **Isadora Clivatti Furigo** 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, 27 de agosto de 2009.

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

*Aos meus pais, Décio e Helena, aos meus irmãos, Isabella
e Neto, e ao meu noivo Lucas, que sempre me apoiaram.
Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, meus pais, irmãos, avós, tios e primos, pela educação, preocupação, incentivo e amor incondicional! Eles são o meu alicerce, minhas inspirações!

Ao meu noivo Lucas, por todo o apoio e carinho, e por sempre estar ao meu lado, incentivando-me e dando-me forças. Admiro-o muito!

Ao meu orientador Newton, por acolher-me em seu laboratório desde o início de minha graduação, por acreditar em mim e permitir-me crescer cientificamente. A ele sou muito grata.

A Sandra, que foi por muito tempo minha “mãe científica”, a ela devo muito do que aprendi no laboratório, ensinamentos que não foram apenas para o meio científico, e sim para a vida! Serei eternamente grata por tudo!

A Simone, a qual trouxe inicialmente a agressão maternal ao laboratório e sempre demonstrou interesse pelo projeto, auxiliando-me em seu desenvolvimento.

A Marcinha, que foi sempre muito solícita, principalmente no momento inicial do desenvolvimento desse projeto.

Ao Wagner e a Cibele, cuja parceria vai muito além do profissional, considero-os como irmãos.

A Amanda, a Cláudia, ao Miguel Rangel e Miguel Xavier, pela companhia e pelos momentos agradáveis que passamos no laboratório.

A todos os funcionários do departamento de Anatomia, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do projeto.

Sou muito grata a todos!

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao
tamanho original”
Albert Einstein*

RESUMO

FURIGO, I. C. **Papel do hipotálamo ventromedial e da parte tuberal do hipotálamo lateral no comportamento de agressão maternal**. 2012. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O comportamento maternal viabiliza a sobrevivência do neonato e apresenta como parâmetros característicos: busca dos filhotes, agrupamento dos mesmos formando um ninho, limpeza dos filhotes, permanência da rata sobre a ninhada em postura para a amamentação e agressão maternal. O termo agressão maternal é apropriado, pois uma fêmea lactante irá atacar machos 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, e não uma agressão competitiva, que visa adquirir recursos. Uma grande variedade de fatores modulam o comportamento de agressão maternal, como a flutuação hormonal, as pistas provenientes da prole e do intruso, e o meio ambiente ao redor. No entanto, a circuitaria neural envolvida nesse comportamento ainda não é muito clara na literatura. Lesões de setores como tálamo mediodorsal, córtex insular, núcleo peripeduncular e parte ventral do hipotálamo ventromedial prejudicaram a agressão maternal, indicando que essas estruturas são importantes nesse comportamento. O hipotálamo apresenta uma região relacionada com o comportamento de agressão, conhecida como “área hipotalâmica de ataque”. Essa área modula ataques afetivos, como os possíveis ataques a co-específicos, mas não os não afetivos, como o ataque predatório. Em estudos prévios desenvolvidos em nosso laboratório, notamos que a parte ventrolateral do núcleo ventromedial do hipotálamo e a parte tuberal do hipotálamo lateral estão particularmente mobilizados em ratas que desempenham o comportamento agressivo maternal. No presente estudo correlacionamos os níveis de agressão maternal de ratas lactantes frente a um macho intruso com a ativação da parte caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (HAA), representada pela região tuberal do hipotálamo lateral (LHA_{tu}) e a parte ventrolateral do núcleo ventromedial (VMH_{vl}), a qual apresentou uma correlação positiva. Também realizamos em um grupo lesões neurotóxicas com NMDA circunscritas a 1/3 caudal da HAA, e em outro grupo lesões que se estenderam por 2/3 caudais do eixo rostro caudal da HAA, e comparamos os comportamentos agressivos de ratas controle com esses grupos de ratas com lesões. Observamos que as ratas dos dois grupos de lesões tiveram prejuízo no comportamento agressivo maternal, sendo que as ratas com lesão de 1/3 caudal HAA apresentaram menor número de ataques e passaram menos tempo desenvolvendo a agressão em relação às ratas controle, e inversamente apresentaram maior latência para iniciarem o ataque, enquanto as ratas com lesão de 2/3 caudais da HAA não realizaram ataques sobre o macho intruso. Os parâmetros não agressivos, como exploração e *sniffing* não apresentaram diferenças entre os grupos, assim como os comportamentos maternos, indicando que as lesões não afetaram o cuidado das fêmeas com a sua prole. Em uma análise da densidade de células Fos positivas de possíveis alvos dessas estruturas hipotalâmicas estudadas, não detectamos diferenças estatísticas entre os grupos com lesão e o grupo controle.

Palavras-chave: Agressividade. Comportamento materno animal. Hipotálamo.

ABSTRACT

FURIGO, I. C. **Role of the ventromedial hypothalamus and tuberalis part of the lateral hypothalamus in maternal behavior aggression.** 2012. 57 p. Masters thesis (Morfofunctional Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The maternal behavior allows the litters survival and comprises several responses, such as puppy retrieval, grouping, grooming, and nursing, as well maternal aggression. During maternal aggression, dams attack an intruder, in order to preserve their offspring. This form of aggression should be distinguished from a competitive aggression that aims to acquire resources. Specific changes in the hormonal profile that occur during lactation and the contact with the pups are necessary priming factors for maternal aggression, which is triggered by pheromonal cues from an intruder male. A great deal remains to be learned about the neural circuitry involved underlying this behavior. The “hypothalamic attack area” is known to modulate affective attacks, such as maternal aggression, but not the non-affectives, like predatory attack. In previous studies from our laboratory, we have observed that the ventrolateral part of ventromedial hypothalamus nucleus (VMHvl) and the tuberal part of lateral hypothalamus (LHA_{tu}) are particularly activated in dams displaying maternal aggression. In the present study, we were able to see a positive correlation between the levels of maternal aggression and Fos expression in the LHA_{tu} and the VMHvl, corresponding to the caudal part of the hypothalamic attack area. Next, we have shown that neurotoxic NMDA lesions restricted to this region practically abolish maternal aggression in lactant rats, but did not affect other parameters related to the maternal care. We have further analyzed the pattern of Fos expression in the brainstem targets of these hypothalamic regions in the NMDA lesioned dams, but couldn't find any difference between lesioned and intact groups, a result that left us without any clue regarding the brainstem mechanisms related to this behavior.

Keywords: Aggressiveness. Animal maternal behavior. Hypothalamus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Células Fos positivas em VMHvl e LHAtu: agressão maternal <i>versus</i> comportamento maternal.....	18
Gráfico 1 - Correlação entre a densidade de células FOS positivas no LHAtu e o número de agressões.....	30
Gráfico 2 - Correlação entre a densidade de células FOS positivas no LHAtu e o tempo de agressões.....	30
Gráfico 3 - Correlação entre a densidade de células FOS positivas no VMHvl e o número de agressões.....	31
Gráfico 4 - Correlação entre a densidade de células FOS positivas no VMHvl e o tempo de agressões.....	31
Figura 2 - Lesão de 1/3 caudais de HAA.....	33
Figura 3 - Lesão de 2/3 caudais de HAA.....	34
Figura 4 - Células Fos positivas no VMHvl e LHAtu: lesão <i>versus</i> controle.....	35
Gráfico 5 - Número de ataques.....	37
Gráfico 6 - Tempo total de ataques.....	37
Gráfico 7 - Latência para realização do primeiro ataque.....	39
Gráfico 8 - Tempo total de <i>grooming</i> agressivo.....	39
Gráfico 9 - Tempo total de <i>sniffing</i>	40
Gráfico 10 - Tempo total de exploração.....	40
Gráfico 11 - Número de vezes em que as ratas amamentam seus filhotes (<i>nursing</i>).....	41
Gráfico 12 - Número de vezes em que as ratas permanecem sobre o ninho.....	42
Gráfico 13 - Número de vezes em que ratas realizam o <i>grooming</i>	42
Gráfico 14 - Número de vezes em que as ratas realizam outros comportamentos.....	43
Gráfico 15 - Densidade de células Fos positivas.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHN- núcleo anterior do hipotálamo

ARH- núcleo arqueado do hipotálamo

DMH- núcleo dorsomedial hipotalâmico

fx – fórnix

HAA – área hipotalâmica de ataque

LHA_{tu} – área hipotalâmica lateral tuberal

MEA – núcleo medial da amígdala

NMDA – ácido N-metil D-aspartico

PAG_{vl} – porção ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal

PM_v – núcleo pré-mamilar ventral

SPF_t – núcleo subparafascicular do tálamo

VMH_a- porção anterior do núcleo ventromedial do hipotálamo

VMH_{dm}- porção dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo

VMH_{vl} – porção ventrolateral do núcleo ventromedial do hipotálamo

Z_{lv} – zona incerta ventral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Animais.....	22
3.2 Acasalamento.....	22
3.3 Lesão citotóxica por NMDA.....	23
3.4 Comportamento maternal.....	23
3.5 Teste comportamental.....	24
3.6 Perfusão e histologia.....	24
3.7 Reação imuno-histoquímica para a detecção da proteína Fos.....	25
3.8 Contagem de células Fos positivas.....	26
3.9 Identificação da lesão neurotóxica.....	27
3.10 Análise estatística.....	27
4 RESULTADOS.....	28
5 DISCUSSÃO.....	45
6 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

Comportamento parental define qualquer comportamento desenvolvido por um membro de uma espécie sobre organismos reprodutivamente imaturos dessa mesma espécie, aumentando a possibilidade desses sobreviverem até a maturidade. Em mamíferos, esse comportamento é definido como maternal, uma vez que o primeiro indivíduo a cuidar do filhote é a fêmea, através da amamentação (NUMAN, 1994).

O comportamento maternal é de fundamental importância para viabilizar a sobrevivência do neonato e é mais intenso na primeira semana após o nascimento da prole, com ápice no quinto dia (NUMAN, 1994). Apresenta como parâmetros característicos: busca dos filhotes, agrupamento dos mesmos formando um ninho, limpeza dos filhotes, permanência da mãe sobre a ninhada em postura para a amamentação e agressão maternal (GAMMIE, 2005). À medida que os filhotes desenvolvem-se e tornam-se independentes, a expressão do comportamento maternal das fêmeas diminui até tornar-se ausente (NUMAN, 1994).

A proteção feroz dos descendentes realizada pelos pais é um comportamento com grande significância adaptativa, e é expresso por diversas espécies de seres vivos (CRAWFORD; BALON, 1996; LEDESMA et al., 1988). Muitas pesquisas científicas sobre comportamento de proteção parental, denominado agressão maternal ou parental, têm sido feitas em roedores (GAMMIE; LONSTEIN, 2005). Nessa classe de mamíferos, na qual o infanticídio por co-específicos não parentais é bastante comum (AGRELL; WOLFF; YLONEN, 1998), o termo agressão maternal é apropriado, pois uma fêmea lactante pode atacar machos 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, e não uma agressão competitiva, que visa adquirir recursos (ARCHER, 1988).

A agressão maternal ocorre tipicamente nas redondezas do ambiente familiar (CALHOUN, 1963). Assim, em animais que apresentam sítios de vivência estáveis, como os roedores, é possível que a agressão maternal seja uma forma de defesa territorial (GAMMIE; LONSTEIN, 2005). Em ratas com filhotes, a forma e a topografia do ataque a um intruso é semelhante à apresentada por machos dominantes em seu território (BLANCHARD et al., 1984; BLANCHARD; BLANCHARD, 1990; FLANNELLY; FLANNELLY, 1987; HANEY; DEBOLD; MICLEK, 1989; MOS et al., 1989), embora a intensidade e o direcionamento dos ataques possam ser diferentes.

Uma importante diferença entre ataques de machos e fêmeas é a segmentação das mordidas. Ao contrário dos machos, uma alta porcentagem das mordidas de

fêmeas é orientada para a cabeça e para a região do focinho do intruso. Também diferenciam-se quanto ao ataque padrão, sendo que nas fêmeas o 'jump-attack' tem maior frequência de expressão, o que não é visto em machos dominantes contra intrusos (BLANCHARD; BLANCHARD, 1981, 1988, 1989; LEYHAUSEN, 1973).

Uma grande variedade de fatores modulam o comportamento maternal agressivo nos animais. Esses fatores incluem as alterações hormonais das mães antes e após o parto; as pistas, principalmente táteis e olfatórias, provenientes dos neonatos; os sinais olfatórios vindos dos intrusos; e o ambiente em que os animais estão situados (GAMMIE; LONSTEIN, 2005).

No entanto, o circuito neural envolvido nesse comportamento ainda não é muito bem definido, e as informações a esse respeito encontram-se bastante esparsas na literatura. Estudos com lesões e manipulação farmacológica sugerem alguns setores neurais provavelmente relacionados a esse comportamento.

Lesões do tálamo mediodorsal ou do córtex insular, que recebem informações olfatórias, diminuíram a agressão maternal (FERREIRA; DAHLOF; HANSEN, 1987). Essas lesões não produzem anosmia, mas prejudicam a habilidade de fazer discriminações olfatórias, dificultando o reconhecimento feito pela rata lactante de um intruso como ameaça potencial, assim como o dos filhotes (LONSTEIN; GAMMIE, 2002). Também, prejuízo na agressão maternal foi observado após lesões no núcleo peripeduncular, que faz parte de via somestésica que veicula as informações táteis da interação com a prole para diversos sítios envolvidos no controle da agressão maternal, como por exemplo, o hipotálamo e estruturas límbicas (FACTOR; MAYER; ROSENBLATT, 1993; HANSEN; FERREIRA, 1986).

A parte ventral do hipotálamo ventromedial também se mostra importante na agressão maternal, pois lesões dessa região, que também incluem regiões adjacentes como o núcleo pré-mamilar ventral, reduziram severamente tal comportamento em ratos (HANSEN, 1989).

Lesões na região septal inibiram a agressão maternal em ratas, porém esses animais também deixaram de responder a seus filhotes (FLANNELLY et al., 1986), indicando que possivelmente a agressão esteja diminuída pela falta de estimulação tátil dos filhotes sobre a rata lactante, fator importante para que o comportamento agressivo maternal seja desenvolvido.

Em contrapartida, lesões pré e pós-parto da área ventrolateral caudal da substância cinzenta periaquedutal diminuíram a latência das ratas para iniciarem o ataque aos intrusos e duplicaram o número de ataques, indicando que essa área inibe tonicamente a agressão maternal (LONSTEIN; STERN, 1997).

Outra estrutura importante para o reconhecimento do adversário como uma ameaça potencial, um competidor sexual ou um intruso em seu território é o sistema vomeronasal. Esse reconhecimento se dá pela ativação feromonal, que induz mudanças hormonais e respostas comportamentais através da ativação do órgão vomeronasal, o qual se projeta para o bulbo olfatório acessório (HALPERN; MARTINEZ-MARCOS, 2003). Desse, a maior parte da informação olfatória chega ao núcleo medial da amígdala - MEA (SCALIA; WINANS, 1975), o qual, por sua vez, se projeta para núcleos hipotalâmicos, como o núcleo pré-óptico medial, núcleo ventromedial e núcleo pré-mamilar ventral (PMv). Dentre esses núcleos, o PMv além de receber essas informações feromonais, integra influências neurais de regiões prosencefálicas particularmente relacionadas ao circuito sexualmente dimórfico, sendo altamente sensível a hormônios sexuais (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1992).

Em estudos realizados em nosso laboratório, observamos o aumento da expressão da proteína Fos no PMv em ratas expostas ao macho intruso que expressaram o comportamento agressivo maternal. Nesse mesmo estudo, observamos que essas ratas apresentaram uma intensa marcação de Fos nas porções caudais da parte ventrolateral do núcleo ventromedial (VMHvl) e na parte tuberal adjacente do hipotálamo lateral (LHA_{tu}) (ver Figura 1). Também pudemos observar que a intensidade da agressividade maternal parece estar diretamente correlacionada à ativação destes sítios hipotalâmicos, inferida pelo número de células imunorreativas a proteína Fos desses setores.

Já é bem conhecido que o hipotálamo apresenta uma região relacionada ao comportamento de agressão, conhecida como “Área Hipotalâmica de Ataque”. A localização anatômica precisa dessa região foi descrita por Kruk et al. (1983, 1984 a,b) e Lammers et al. (1988) como sendo uma extensa região hipotalâmica que inclui porções ventrais do núcleo hipotalâmico anterior, a área retroquiasmática, a parte ventrolateral do núcleo ventromedial e a região tuberal do hipotálamo lateral, e corresponde a região que apresenta o menor limiar para deflagrar respostas de ataque. Desta forma, a área hipotalâmica de ataque modula os ataques afetivos,

como possivelmente a agressão maternal, mas não os não afetivos, como o ataque predatório. Segundo Bhatia et al. (1995), o ataque afetivo é modulado por porções ventrais e laterais do hipotálamo, enquanto respostas de ataque não afetivo são moduladas por regiões dorsomediais do hipotálamo, que não correspondem à área hipotalâmica de ataque classicamente descrita.

Segundo Roberts e Nagel (1996), a via de projeção que apresenta a maior correlação com ataque é o braço descendente da comissura supraóptica que passa lateralmente e posteriormente a superfície dorsal e medial do trato óptico para alcançar a área peripeduncular, núcleo subparafascicular, zona incerta ventral e região cuneiforme. Todas essas áreas de projeção recebem aferências diretas do hipotálamo ventromedial e região tuberal do hipotálamo lateral (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1994).

Ainda segundo Roberts e Nagel (1996), o hipotálamo ventromedial e suas projeções para a área peripeduncular têm sido considerados importantes no comportamento agressivo maternal. Lesões eletrolíticas ou com ácido ibotênico do hipotálamo ventromedial, e lesões eletrolíticas da área peripeduncular suprimiram a agressividade intensificada por ratas lactantes (HANSEN, 1989; HANSEN; FERREIRA, 1986).

Diante das evidências descritas na literatura e de observações dos estudos realizados no laboratório, postulamos que as porções caudais da Área Hipotalâmica de Ataque, mais precisamente a parte ventrolateral do núcleo Ventromedial (VMHvl) e a parte tuberal adjacente do Hipotálamo Lateral (LHA_{tu}) devam ser os sítios hipotalâmicos críticos para a expressão do comportamento agressivo maternal.

Figura 1 - Células Fos positivas em VMHvl e LHAtu: agressão maternal *versus* comportamento maternal.

Fotomicrografias em campo claro de cortes frontais imunorreagidos para detecção da proteína Fos, ilustrando células marcadas na parte ventrolateral do núcleo ventromedial do hipotálamo (VMHvl) e na parte tuberal do hipotálamo lateral (LHAtu) do encéfalo de rata lactante após a expressão do comportamento agressivo maternal (A) e de rata lactante não exposta ao macho intruso após a expressão do comportamento maternal (B). fx – fórnix.
FONTE: Furigo (2012).

2 OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo avaliar o papel da Área Hipotalâmica de Ataque (HAA) para a expressão do comportamento de agressão maternal. Em particular, analisamos a participação da parte ventrolateral do núcleo ventromedial (VMHvl) e área tuberal do hipotálamo lateral (LHA_{tu}) na expressão do comportamento agressivo maternal. Para tanto, primeiramente correlacionamos a densidade de células imunorreativas à proteína Fos no VMHvl e no LHA_{tu} com o nível de agressão maternal em ratas lactantes expostas a um macho intruso. Em uma segunda etapa avaliamos os efeitos de lesões citotóxicas por NMDA em porções da HAA sobre o comportamento agressivo maternal, e por fim analisamos a densidade de células FOS positivas em possíveis alvos desses setores hipotalâmicos nos grupos com lesão e grupos controle.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse projeto foram realizados 2 experimentos com o intuito de avaliarmos o papel do VMHvl e LHA_{tu} no comportamento agressivo maternal. Em um primeiro momento do projeto, em que estávamos estabelecendo a padronização comportamental da agressão maternal, realizamos testes com 13 ratas lactantes intactas, as quais apresentaram variações no nível de agressão. Devido a isso, realizamos uma correlação entre os níveis de agressão desenvolvidos por elas e a ativação dos núcleos VMHvl e LHA_{tu} (pela densidade de células Fos positivas). Em um segundo momento, depois de ajustarmos o teste comportamental para o período escuro e detectarmos uma padronização do comportamento agressivo, fizemos a segunda parte do projeto, em que realizamos cirurgias estereotáticas de lesão com NMDA em porções da HAA, dividindo em 2 grupos experimentais : 1/3 caudal e 2/3 caudais desse setor, e analisamos o comportamento agressivo maternal, comparando com um grupo controle realizado também nesse momento do projeto. Ainda aproveitamos para analisar a ativação de setores alvos de projeção do VMHvl e LHA_{tu} nesses casos de lesão, para tentarmos entender a via reguladora do comportamento agressivo maternal. Nessas duas etapas de experimentação foram utilizados os mesmos métodos abaixo especificados, com exceções da cirurgia estereotática de lesão e a análise do comportamento maternal, os quais foram realizados apenas na segunda etapa do projeto.

3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Long Evans*, machos (n=30) e fêmeas (n=120) , e ratos *Wistar* machos (n=40), do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB - USP), com 90 dias de idade ao início do experimento. Os animais foram mantidos num ciclo claro/escuro de 12/12 h, com acesso livre à ração e água. Todos os protocolos foram aprovados pela “Comissão de Ética em Experimentação Animal” do ICB (protocolo nº 051.09-CEEA).

3.2 Acasalamento

Ao final do período claro do dia, ratas que se encontravam no período de transição da fase pró-estro para o estro, foram colocadas na gaiola de um macho sexualmente experiente para o acasalamento. As ratas permaneceram na gaiola dos

machos para acasalamento durante um período de dez dias consecutivos. Após este período, elas foram colocadas em gaiolas individuais e os partos foram acompanhados diariamente.

3.3 Lesão citotóxica por NMDA

Foram realizadas cirurgias estereotáxicas nas ratas no período em torno do 15º ao 17º dias de prenhes. Os animais foram anestesiados 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 posicionados no aparelho estereotáxico, onde receberam depósitos iontoforéticos bilaterais de uma solução de ácido-N-metil-D-aspartico (NMDA- Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, United States of America) a 0,15M na Área Hipotalâmica de Ataque, sendo que em 50 animais centralizamos as pipetas na porção caudal dos núcleos VMHvl e LHAtu, e em outro grupo de 50 animais posicionamos as pipetas em porções mais intermediárias da HAA. Devido a condição de maior fragilidade das ratas prenhas, tivemos problemas com a sobrevivência delas e com abortos, que ocorreram com uma certa frequência, reduzindo o número de ratas com lesão submetidas ao teste comportamental de confronto com o intruso para 5 em cada grupo. 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 (Midgard Eletronics- Modelo CS3, Watertown, MA, United States of America).

3.4 Comportamento maternal

Com o objetivo de avaliarmos se a lesão citotóxica por NMDA poderia interferir no comportamento maternal, todas as fêmeas dos grupos controle (n=7), com lesão de 1/3 caudal da HAA (n=5) e com lesão de 2/3 caudais da HAA (n=5) foram observadas nos dias 1, 2 e 3 de lactação no período claro do dia por 50 minutos, sendo realizadas 10 observações de 3 segundos com um intervalo de 5 minutos, nas quais anotávamos o que a rata estava fazendo, dentro dos parâmetros comportamentais analisados, e no final tínhamos o número absoluto de vezes em que as ratas realizavam determinados comportamentos. Os parâmetros comportamentais

analisados foram: número de vezes em que a fêmea encontra-se realizando “*nursing*” (fêmea arqueada sobre os filhotes em posição de amamentação), ficando em contato com mais da metade da ninhada, limpando os filhotes (“*grooming* dos filhotes) e realizando outros comportamento não maternos como, permanecendo-se fora do ninho, comendo ou bebendo.

3.5 Teste comportamental

No dia três do pós-parto foi feita a padronização da ninhada de cada fêmea para oito filhotes. Os testes comportamentais foram realizados nos dias cinco ou seis de lactação, na primeira hora do escuro. No dia do teste, as ratas foram habituadas na caixa experimental por 60 minutos. Após este tempo, foi colocado na caixa um macho adulto da linhagem *Wistar* e o teste encerrou-se cinco minutos após a introdução desse intruso na caixa experimental. O comportamento foi gravado para análise comportamental posterior, e foram analisados o tempo total de expressão dos comportamentos agressivos, sociais e de exploração do ambiente, além da latência da fêmea para iniciar um ataque.

Como comportamentos agressivos maternos foram avaliados os parâmetros postulados por Lonstein e Stern (1997): o *grooming* agressivo, envolvendo a investigação com a boca da região do focinho e orelhas do macho intruso, e ataque, caracterizado pela investida com um pulo em direção ao macho intruso seguido de luta, mordida e pressionamento do intruso.

Quanto ao comportamento social, foram avaliados o ato cheirar o intruso (“*sniffing*”), cheirar a região anogenital e fazer “*grooming*” social, sendo que todos esses comportamentos foram agrupados no parâmetro denominado *sniffing*.

Os vídeos foram submetidos à análise comportamental utilizando o programa The Observer (Noldus, Leesburg, VA, Estados Unidos da América).

3.6 Perfusão e Histologia

Noventa minutos após o teste, as fêmeas foram anestesiadas por via intraperitoneal com Hidrato de Cloral (0,4 ml / 100 g de peso corpóreo, Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e em seguida perfundidas por via trans-aórtica, utilizando uma bomba peristáltica (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, United States of America), com 150

ml de solução de Cloreto de Sódio 0,9% (LabSynth, Diadema, SP, Brasil) e, em seguida, com 500 ml de Paraformaldeído a 4% (LabSynth) diluído em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4) (LabSynth). O animal foi mantido sob refrigeração por 3 horas e, após esse período, o encéfalo foi retirado da caixa craniana e mantido em solução de sacarose a 20% em tampão fosfato de potássio 0,02M (LabSynth), por aproximadamente 12 horas.

Foram obtidos cortes com 40 μ m de espessura, utilizando-se um micrótomo de congelação (Carl Zeiss, Heidelberg, BW, Germany) armazenados em cinco séries, sendo uma série preparada para a reação imuno-histoquímica para detecção da proteína Fos e uma outra série adjacente foi submetida a coloração por tionina (método de Nissl), para a identificação da lesão citotóxica.

3.7 Reação imuno-histoquímica para detecção da proteína Fos

No processamento imuno-histoquímico para detecção da proteína Fos, os cortes foram incubados inicialmente em uma solução de tampão fosfato de potássio 0,02M (LabSynth) contendo triton X-100 a 0,3% (Sigma-Aldrich), soro normal de cabra a 2% e anticorpo primário anti-Fos obtido em coelho (Calbiochem, Darmstadt, HE, Germany) 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, Burlingame, CA, Estados Unidos da América) na diluição 1:200. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado usando-se a técnica de glicose oxidase com o complexo biotina-avidina (ABC Elite Kit, Vector Laboratories). Para ligar a glicose oxidase ao complexo antígeno-anticorpo, seguindo o protocolo de Itoh et al. (1979), ou seja, após lavagens sucessivas, os cortes foram incubados em uma solução contendo 50 mg de tetrahidrocloreto de 3-3'diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich), 0,6 mg de glicose oxidase, 40 mg de cloreto de amônio e 2 ml de solução aquosa de sulfato de níquel a 10% (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, United States of America) em 100 ml de tampão fosfato de sódio 0,1M (LabSynth) por 5 minutos. Em seguida foi adicionado β -D-glicose (Sigma-Aldrich), e a reação enzimática foi interrompida após um período de tempo variável, em geral em torno de 15 minutos. Após a reação de imuno-histoquímica, os cortes foram montados em

lâminas recobertas com gelatina e em seguida, os cortes foram desidratados e recobertos com DPX (Sigma-Aldrich).

3.8 Contagem de células Fos positivas

As imagens geradas das regiões encefálicas escolhidas foram feitas utilizando a objetiva de 10X de um microscópio Nikon Eclipse 80i (Nikon, Garden City, NY, United States of America) equipado com uma câmera digital Nikon DXM 1200F. Para quantificação das células, nós inicialmente escolhemos o corte que continha o núcleo de interesse, delineamos as bordas desse núcleo definido pela série corada pelo método de Nissl e as células imunoreativas para Fos foram contadas na área delimitada. Apenas os núcleos celulares ovais bastante escuros e dentro das bordas da região selecionada foram contados. A densidade de células marcadas foi determinada dividindo o número de células imunorreativas à proteína Fos pela área da região de interesse. Para cada estrutura os dados de densidade foram medidos isoladamente nos dois lados de cérebro, e para cada caso a densidade de cada sítio neural representa a média da densidade entre os dois lados. Tanto a contagem de células, quanto a medição da área foram feitos com a ajuda do programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Sylver Spring, MD, United States of America). O parcelamento das regiões encefálicas segue o atlas The Brain Maps: Structure of the rat brain (SWANSON, 2004). Na primeira parte do projeto, foram contadas as porções tuberal do hipotálamo lateral (LHA_{tu}) e ventrolateral do núcleo ventromedial (VMH_{vl}) para fazermos a correlação entre a ativação dessas áreas e o nível de agressão das ratas submetidas ao confronto com um macho intruso. Também, fizemos a contagem de células Fos positivas de setores de projeção dessas porções hipotalâmicas, como núcleo subparafascicular do tálamo e zona incerta ventral, área peripeduncular, núcleo cuneiforme e substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (porção caudal). Além disso, a observação dos cortes submetidos à reação imuno-histoquímica para a detecção de proteína Fos serviu como parâmetro para avaliarmos o quanto as lesões neurotóxicas foram capazes de inativar os neurônios de setores da Área Hipotalâmica de Ataque.

3.9 Identificação da lesão neurotóxica

A segunda série de cortes dos encéfalos foi montada em lâminas gelatinadas, as quais foram coradas pelo método de Nissl com tionina a 0,25% (Sigma-Aldrich) como corante, recobertas com lamínulas com DPX (Sigma-Aldrich) e analisadas em microscópio óptico (Nikon E600) com campo claro para a detecção das áreas de perda celular e gliose promovidas pela lesão neurotóxica.

3.10 Análise estatística

Aplicamos os testes de normalidade de D'Agostino e Pearson e de variância de Bartlett, que indicaram distribuição normal e homocedasticidade dos dados. Desta forma, utilizamos o teste Anova uma via com pós-teste de Newman-Keuls para comparação de médias entre os grupos, e o teste de correlação de Pearson para avaliação de correlação entre variáveis, utilizando o GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, United States of America). Adotamos o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

4 RESULTADOS

Realizamos testes comportamentais de agressão maternal em três grupos de fêmeas lactantes: grupo controle (n=7) , grupo com lesão neurotóxica bilateral com NMDA em 1/3 caudal da Área Hipotalâmica de ataque (1/3 caudal HAA, n=5) e grupo com lesão neurotóxica bilateral com NMDA que se estendeu por 2/3 caudais do eixo rostro caudal da Área Hipotalâmica de ataque (2/3 caudais HAA, n=5) .

Por observarmos um padrão de expressão de proteína Fos exuberante nas porções caudais da Área Hipotalâmica de Ataque, especificamente nas porções ventrolateral do núcleo Ventromedial (VMHvl) e tuberal do Hipotálamo Lateral (LHA_{Tu}), em ratas intactas submetidas ao confronto com um macho intruso, realizamos, como primeira etapa, a quantificação da densidade de células Fos-positivas nessas regiões, e examinamos a relação da ativação destes sítios com a expressão do comportamento agressivo maternal. Devido a variação de níveis de agressão entre as ratas intactas testadas, pudemos fazer testes de correlação, comparando a densidade do número de células imunorreativas à proteína Fos em cada uma destas áreas com o número de agressões (gráficos 1 e 3) e como o tempo total de agressões (gráficos 2 e 4) desempenhados pelas ratas lactantes analisadas.

Pode-se notar que existe correlação diretamente proporcional e significativa entre a ativação dos núcleos analisados e o número de ataques que as fêmeas lactantes realizaram frente aos machos intrusos, sendo que há uma correlação levemente maior do LHA_{Tu} com o número de agressões (gráfico 1; $r = 0,95$; $p < 0,0001$) do que a correlação do VMHvl (gráfico 3; $r = 0,80$; $p < 0,0012$).

Apesar de um pouco menor, a correlação entre a ativação desses núcleos e o tempo total de agressão também existe, sendo que nesse caso a correlação do VMHvl (gráfico 4; $r = 0,67$; $p < 0,0142$) é maior que a do LHA_{Tu} (gráfico 2; $r = 0,59$; $p = 0,0345$).

Gráfico 1 - Correlação entre a densidade de células FOS positivas no LHAtu e o número de agressões.
 $r = 0,95$; $p < 0,0001$.

FONTE: Furigo (2012).

Gráfico 2 - Correlação entre a densidade de células FOS positivas no LHAtu e o tempo de agressões.
 $r = 0,59$; $p = 0,0345$.

FONTE: Furigo (2012).

Gráfico 3 - Correlação entre a densidade de células FOS positivas no VMHvl e o número de agressões. $r = 0,80$; $p < 0,0012$.

FONTE: Furigo (2012).

Gráfico 4 - Correlação entre a densidade de células FOS positivas no VMHvl e o tempo de agressões. $r = 0,67$; $p < 0,0142$.

FONTE: Furigo (2012).

Constatada a correlação entre as estruturas que compõem a porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque e os níveis de agressão desempenhados por fêmeas lactantes expostas a um macho intruso, realizamos, como segunda etapa do projeto, lesões neurotóxicas bilaterais com NMDA em dois grupos de ratas prenhas: em um grupo centralizamos as lesões na porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (1/3 caudal HAA), mais especificamente no VMHvl e no LHAtu caudais; e em outro grupo realizamos lesões neurotóxicas bilaterais com NMDA que se estenderam por 2/3 caudais da Área Hipotalâmica de Ataque, englobando uma maior extensão do VMHvl e LHAtu (2/3 caudais HAA). Essas lesões acometeram maiores porções do LHAtu que no VMHvl, mas a pequena ativação de Fos desse setor mostra que ele ficou funcionalmente inativo, assim como o LHAtu. Nas figuras 2 e 3 ilustramos 3 níveis da Área Hipotalâmica de Ataque, da porção rostral à caudal, sendo a figura 2 representativa da lesão 1/3 caudal HAA e a figura 3 da lesão 2/3 caudais HAA.

A fim de avaliarmos o padrão de ativação da região que recebeu o depósito de NMDA, examinamos a imunorreatividade à proteína Fos ao longo da área hipotalâmica de ataque. A figura 4 ilustra dois cortes frontais imunorreagidos à proteína Fos de ratas submetidas ao teste comportamental de agressão maternal, sendo a figura 4A representativa da porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque de um caso de lesão desse setor (1/3 caudal HAA), onde observa-se uma baixa marcação de células Fos-positivas, em comparação com uma rata controle (Figura 4B).

Figura 2 - Lesão de 1/3 caudais de HAA.

Fotomicrografias em campo claro de cortes frontais submetidos à coloração de Nissl ilustrando a extensão da lesão do grupo de fêmeas submetidas à cirurgia neurotóxica da porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (HAA), caracterizado por perda celular e gliose. As letras **A**, **B** e **C** representam os níveis rostro-caudais da HAA, compreendendo 2/3 caudais de toda a extensão dessa área. O nível **A** não foi acometido com a lesão; o nível **B** apresentou acometimento pequeno apenas de um lado da HAA; e o nível **C**, o nível mais caudal, com acometimento bilateral da parte ventrolateral do núcleo ventromedial do hipotálamo (VMHvl) e da parte tuberal do hipotálamo lateral (LHA_{tu}). As lesões estão delimitadas pelo hachurado. AHN- núcleo anterior do hipotálamo; ARH- núcleo arqueado do hipotálamo; DMH- núcleo dorsomedial hipotalâmico; fx – fórnix; VMHa- porção anterior do núcleo ventromedial do hipotálamo; VMHdm- porção dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo; VMHvl- porção ventrolateral do núcleo ventromedial do hipotálamo.

FONTE: Furigo (2012).

Figura 3 - Lesão de 2/3 caudais de HAA.

Fotomicrografias em campo claro de cortes frontais submetidos à coloração de Nissl ilustrando a extensão da lesão do grupo de fêmeas submetidas à cirurgia neurotóxica extensa da Área Hipotalâmica de Ataque (HAA), caracterizado por perda celular e gliose. As letras **A**, **B** e **C** representam os níveis rostro-caudais da HAA, compreendendo 2/3 caudais de toda a extensão dessa área. Nesse grupo todas as porções foram acometidas bilateralmente pela lesão, delimitada pelo hachurado. AHN- núcleo anterior do hipotálamo; ARH- núcleo arqueado do hipotálamo; DMH- núcleo dorsomedial hipotalâmico; fx – fórnix; VMHdm- porção dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo; VMHvl- porção ventrolateral do núcleo ventromedial do hipotálamo. FONTE: Furigo (2012).

Figura 4 - Células Fos positivas no VMHvl e LHAtu: lesão *versus* controle.

Fotomicrografias em campo claro de cortes frontais imunorreagidos para detecção da proteína Fos, ilustrando células marcadas do encéfalo de rata lactante submetida à cirurgia neurotóxica de lesão da parte ventrolateral do núcleo ventromedial do hipotálamo (VMHvl) e da parte tuberal do hipotálamo lateral (LHAtu), após a expressão do comportamento agressivo maternal (**A**); e de rata lactante controle após a expressão do mesmo comportamento (**B**). DMH- núcleo dorsomedial hipotalâmico; fx – fórnix; VMHdm- porção dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo; VMHvl- porção ventrolateral do núcleo ventromedial do hipotálamo; LHAtu- porção tuberal do hipotálamo lateral.

FONTE: Furigo (2012).

A análise comportamental desses três grupos, o grupo sem lesão (controle), o grupo com lesão de 1/3 caudal da HAA e o com lesão de 2/3 caudais da HAA mostrou algumas diferenças nos parâmetros agressivos, como o número de ataques, o tempo total dos ataques, a latência para o primeiro ataque e o tempo de *grooming* agressivo. Parâmetros sociais como o tempo de *sniffing* (cheirar o intruso) e tempo de exploração, assim como parâmetros maternos analisados anteriormente ao teste de confronto com o intruso, permaneceram sem alterações significativas na comparação entre os grupos.

Conforme ilustrado no gráfico 5, o número de ataques realizados pelos grupos com lesão foi significativamente menor do que o número de ataques realizados pelas ratas sem lesão (controle: $7,28 \pm 0,89$; 1/3 caudal HAA: $0,6 \pm 0,4$; 2/3 caudais HAA: 0 ± 0 ; $p < 0,001$). Quanto ao tempo total que as ratas permaneceram atacando o macho intruso, os grupos com lesão também exibiram valores menores que os animais controle (controle: $18,17 \pm 3,54$; 1/3 caudal HAA: $4,47 \pm 3,03$; 2/3 caudais HAA: 0 ± 0 ; $p < 0,01$. Gráfico 6).

Já a latência para o primeiro ataque, como pode ser visto no gráfico 7, foi significativamente maior nos grupos com lesões de setores da Área Hipotalâmica de Ataque, quando comparados ao grupo controle (controle: $72,62 \pm 5,86$; 1/3 caudal HAA: $254,1 \pm 28,19$; 2/3 caudais HAA: 300 ± 0 ; $p < 0,001$). Adotamos o valor de latência de 300 segundos (tempo total do teste comportamental) para as fêmeas que não atacaram os machos intrusos, sendo que no grupo 2/3 caudais HAA, todas as fêmeas ficaram com esse valor.

Gráfico 5 – Número de ataques.

Número de vezes que as ratas lactantes atacam os machos intrusos no grupo controle (n=7), grupo com lesão na porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (1/3 caudal HAA, n=5), e grupo com lesão de 2/3 caudais da extensão rostro-caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (2/3 caudais HAA, n=5). *** $p < 0,001$, $F(2,14) = 38,57$.

FONTE: Furigo (2012).

Gráfico 6 – Tempo total de ataques.

Tempo total que as ratas lactantes atacam os machos intrusos no grupo controle (n=7), grupo com lesão na porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (1/3 caudal HAA, n=5), e grupo com lesão de 2/3 caudais da extensão rostro-caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (2/3 caudais HAA, n=5).

** $p < 0,01$, $F(2,14) = 10,67$.

FONTE: Furigo (2012).

Gráfico 7 – Latência para realização do primeiro ataque.

Latência desempenhada por ratas lactantes para realizarem o primeiro ataque ao macho intruso do grupo controle (n=7), grupo com lesão na porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (1/3 caudal HAA, n=5), e grupo com lesão de 2/3 caudais da extensão rostro-caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (2/3 caudais HAA, n=5). *** $p < 0,001$, $F(2,14) = 71,61$.

FONTE: Furigo (2012).

No parâmetro *grooming* agressivo, observamos uma diminuição do tempo desempenhando em tal comportamento somente nas ratas com lesão total da Área Hipotalâmica de Ataque em relação ao controle. No entanto, não há diferença estatística entre o grupo controle e o grupo com lesão na porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque, conforme ilustrado no gráfico 8 (controle: $19,40 \pm 4,82$; 1/3 caudal HAA: $9,05 \pm 3,87$; 2/3 caudais HAA: $3,28 \pm 1,85$; $p < 0,05$).

Gráfico 8 – Tempo total de *grooming* agressivo.

Tempo total em que as ratas lactantes realizam *grooming* agressivo (ato de cheirar o intruso na região da cabeça) do grupo controle (n=7), grupo com lesão na porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (1/3 caudal HAA, n=5), e grupo com lesão de 2/3 caudais da extensão rostro-caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (2/3 caudais HAA, n=5). *p<0,05, F(2,14)= 4,183.

FONTE: Furigo (2012).

Já, os parâmetros como tempo de *sniffing* (ato de cheirar o intruso; gráfico 9; controle: 62,54 ± 4,19; 1/3 caudal HAA: 79,43 ± 14,61; 2/3 caudais HAA: 51,96 ± 3,15; p=0,11) e tempo de exploração (gráfico 10; controle: 42,08 ± 11,50; 1/3 caudal HAA: 61,36 ± 16,43; 2/3 caudais HAA: 27,70 ± 9,80 ; p=0,24) não apresentam diferenças estatísticas entre os grupos analisados.

Gráfico 9 – Tempo total de *sniffing*.

Tempo total que as ratas lactantes farejam o macho intruso (*sniffing*) nos grupos controle (n=7), grupo com lesão na porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (1/3 caudal HAA, n=5), e grupo com lesão de 2/3 caudais da extensão rostro-caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (2/3 caudais HAA, n=5). $p=0,11$, $F(2,14)= 2,589$.

FONTE: Furigo (2012).

Gráfico 10 – Tempo total de exploração.

Tempo total que as ratas lactantes exploram o ambiente nos grupos controle (n=7) grupo com lesão na porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (1/3 caudal HAA, n=5), e grupo com lesão de 2/3 caudais da extensão rostro-caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (2/3 caudais HAA, n=5). $p=0,24$, $F(2,14)= 1,554$.

FONTE: Furigo (2012).

Para analisarmos se as lesões prejudicaram os comportamentos maternos desempenhados pelas ratas lactantes submetidas a tal procedimento, medimos o número de vezes, dentro de 10 observações realizadas em 50 minutos, em que as ratas realizam *nursing* (gráfico 11; controle: $24 \pm 0,69$; 1/3 caudal HAA: $24,2 \pm 1,2$; 2/3 caudais HAA: $24,4 \pm 1,122$; $p= 0,9566$), permanência sobre o ninho (gráfico 12; controle: $25,38 \pm 1,017$; 1/3 caudal HAA: $27,17 \pm 1,108$; 2/3 caudais HAA: $25,67 \pm 1,33$; $p=0,5167$), *grooming* dos filhotes (gráfico 13; controle: $3,714 \pm 0,6801$; 1/3 caudal HAA: $4,2 \pm 0,5831$; 2/3 caudais HAA: $4 \pm 0,5477$; $p= 0,8581$) e outros comportamentos não relacionados ao maternal (gráfico 14; controle: $1,714 \pm 0,4206$; 1/3 caudal HAA: $1,8 \pm 0,5831$; 2/3 caudais HAA: $1,8 \pm 0,5831$; $p= 0,99$) por 3 dias consecutivos. Como mostrado nos gráficos abaixo, nenhum dos parâmetros apresentou diferenças estatisticamente significantes, indicando que tanto as lesões da porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque, como lesões que pegaram esse setor em 2/3 de sua extensão, não causaram prejuízos no comportamento maternal das ratas lactantes.

Gráfico 11 – Número de vezes em que as ratas amamentam seus filhotes (*nursing*).

Número de vezes, dentro das 10 observações realizadas por 3 dias, em que ratas lactantes amamentam seus filhotes (*nursing*) no grupo controle (n=7), grupo com lesão na porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (1/3 caudal HAA, n=5), e grupo com lesão de 2/3 caudais da extensão rostro-caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (2/3 caudais HAA, n=5). $p=0,9566$, $F(2,14)= 0,0445$.

FONTE: Furigo (2012).

Gráfico 12 – Número de vezes em que as ratas permanecem sobre o ninho.

Número de vezes, dentro das 10 observações realizadas por 3 dias, em que ratas lactantes permanecem sobre o ninho no grupo controle (n=7), grupo com lesão na porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (1/3 caudal HAA, n=5), e grupo com lesão de 2/3 caudais da extensão rostro-caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (2/3 caudais HAA, n=5). $p=0,5167$, $F(2,14)=0,6866$.

FONTE: Furigo (2012).

Gráfico 13 – Número de vezes em que as ratas realizam o *grooming*.

Número de vezes, dentro das 10 observações realizadas por 3 dias, em que ratas lactantes realizam a limpeza de seus filhotes (*grooming*) no grupo controle (n=7), grupo com lesão na porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (1/3 caudal HAA, n=5), e grupo com lesão de 2/3 caudais da extensão rostro-caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (2/3 caudais HAA, n=5). $p=0,8581$; $F(2,14)=0,1548$.

FONTE: Furigo (2012).

Gráfico 14 – Número de vezes em que as ratas realizam outros comportamentos.

Número de vezes, dentro das 10 observações realizadas por 3 dias, em que ratas lactantes realizam outros comportamentos, não relacionados ao maternal, no grupo controle (n=7), grupo com lesão na porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (1/3 caudal HAA, n=5), e grupo com lesão de 2/3 caudais da extensão rostro-caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (2/3 caudais HAA, n=5). $p=0,99$; $F(2,14) = 0,010$.

FONTE: Furigo (2012).

Segundo Roberts e Nagel (1996), a via de projeção que apresenta a maior correlação com ataque é o braço descendente da comissura supraóptica que passa lateralmente e posteriormente a superfície dorsal e medial do trato óptico para alcançar a área peripeduncular, núcleo subparafascicular, zona incerta ventral e região cuneiforme, as quais recebem aferências diretas do hipotálamo ventromedial e região tuberal do hipotálamo lateral (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1994). Em contrapartida, lesões pré e pós-parto da área ventrolateral caudal da substância cinzenta periaquedutal diminuíram a latência das ratas para iniciarem o ataque aos intrusos e duplicaram o número de ataques, indicando que essa área inibe tonicamente a agressão maternal (LONSTEIN; STERN, 1997).

Pensando nisso, fizemos uma análise da densidade de células Fos positivas nos setores acima mencionados (Gráfico 14), porém não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos analisados: núcleo Subparafascicular do Tálamo e Zona Incerta ventral (Controle: $249,8 \pm 48,39$; 1/3 caudal HAA: $209,3 \pm 37,03$; 2/3 caudais HAA: $246,9 \pm 33,03$; $p=0,7540$; $F(2,14)= 0,2886$), Área Peripeduncular (Controle: $193,6 \pm 40,81$; 1/3 caudal HAA: $151,6 \pm 025,16$; 2/3 caudais HAA: $189,9 \pm 25,05$; $p= 0,3428$; $F(2,14)= 1,164$), Região Cuneiforme (Controle:

71,08 $\pm$ 23,7; 1/3 caudal HAA: 81,54 $\pm$ 9,324; 2/3 caudais HAA: 92,0 $\pm$ 13,58 ; $p=0,7116$; $F(2,14)=0,3493$) e Substância Cinzenta Periaquedutal Ventrolateral caudal (Controle: 164,5 $\pm$ 27,67; 1/3 caudal HAA: 178,1 $\pm$ 13,38; 2/3 caudais HAA: 242,0 $\pm$ 37,52; $p=0,1875$; $F(2,14)=2,138$).

Gráfico 15 – Densidade de células Fos positivas.

Densidade de células Fos positivas do grupo controle (n=7), grupo com lesão na porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (1/3 caudal HAA, n=5), e grupo com lesão de 2/3 caudais da Área Hipotalâmica de Ataque (2/3 caudais HAA, n=5), nas áreas: **(A)** área que engloba o Núcleo Subparafascicular do tálamo (SPFt) e a Zona Incerta ventral (Zlv) ($p=0,5972$), **(B)** Área Peripeduncular ($p=0,5972$), **(C)** Área Cuneiforme ($p=0,7116$) e **(D)** Substância Cinzenta Periaquedutal ($p=0,1875$).
 FONTE: Furigo (2012).

5 DISCUSSÃO

A agressão maternal constitui uma forma de proteção dos filhotes exercida por uma fêmea lactante a fim de preservar a vida de sua ninhada, diferentemente de um comportamento de agressão competitiva, que visa adquirir recursos (ARCHER, 1988).

No presente estudo tivemos o intuito de compreendermos a participação de setores da Área Hipotalâmica de Ataque na agressão maternal, e para tanto realizamos primeiramente uma análise de correlação entre a densidade de células Fos-positivas do VMHvl e do LHAtu e os níveis de agressão desenvolvidos por ratas submetidas ao teste de agressão maternal. Pudemos notar que existe correlação diretamente proporcional e significativa entre a ativação dos núcleos analisados e o número e tempo total dos ataques que as fêmeas lactantes realizaram frente aos machos intrusos, demonstrando que esses setores podem estar relacionados com o comportamento de ataque na agressão maternal.

Na sequência, avaliamos o comportamento de agressão maternal em três grupos de ratas: grupo controle, grupo com lesão bilateral no 1/3 caudal da Área Hipotalâmica de Ataque (1/3 caudal HAA, englobando metade caudal do VMHvl e LHAtu), e grupo com lesão dos 2/3 caudais da HAA (2/3 caudais HAA). Já é largamente conhecido que a HAA pode ser definida por apresentar os menores limiares de estimulação elétrica para deflagrar um ataque (ROELING et al., 1994).

A análise comportamental dos grupos estudados mostrou que os parâmetros como o número de ataques desenvolvidos pelas fêmeas e o tempo total em que elas permaneceram atacando foram menores em ratas dos dois grupos de lesão quando comparadas com as ratas controle. Também, a latência para iniciar o primeiro ataque foi maior nos grupos de lesão em relação ao grupo controle. Isso, segundo o que postulamos, se deve ao fato de as lesões da porção caudal da Área Hipotalâmica de Ataque, bem como as lesões extensas da mesma área, terem inibido funcionalmente as áreas VMHvl e LHAtu, o que prejudicou o desempenho agressivo das ratas por, provavelmente, se tratarem de estruturas importantes para o desencadeamento e a manutenção de tal comportamento. 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; FERREIRA, 1986).

Outro parâmetro relacionado ao comportamento agressivo maternal, denominado *grooming* agressivo, é caracterizado pelo ato da fêmea cheirar a região da cabeça do macho intruso, e parece representar um tipo de agressão menos ofensiva, uma vez que não resulta em um ataque propriamente dito. Também não deve ser considerado simplesmente um comportamento social, como por exemplo, é o *sniffing*, o qual é comumente realizado por ratos residentes frente a um intruso (BLANCHARD; BLANCHARD, 1977), diferentemente do *grooming* agressivo, não observado nesse modelo de agressão.

As ratas com lesão de 1/3 caudal da HAA realizaram a mesma quantidade de *grooming* agressivo que as ratas controle. Em um trabalho recente, Halasz et al. (2009) observou que a administração sistêmica de um bloqueador de receptores NK1, os quais são expressos em neurônios ativos da Área Hipotalâmica de Ataque no modelo de confronto entre residente e intruso, diminuiu dramaticamente os ataques ofensivos, mas não afetou as mordidas suaves, ou seja, o comportamento menos ofensivo ficou mantido, o que seria algo semelhante ao parâmetro de *grooming* agressivo em nosso modelo, que se manteve no grupo 1/3 caudal HAA. Já o grupo com lesão 2/3 caudais HAA realizou menos *grooming* agressivo em relação ao grupo controle, provavelmente pelo fato da lesão ser mais extensa da Área Hipotalâmica de Ataque e ter provocado uma diminuição de qualquer manifestação de comportamentos agressivos de forma mais dramática.

Outros parâmetros como *sniffing* e exploração, que foram semelhantes entre ratas controle e as ratas com lesões, demonstram que, mesmo com a lesão da HAA, as ratas parecem reconhecer o macho intruso como uma ameaça em potencial, mas não conseguem atacá-lo de modo eficiente. Observamos, em uma análise qualitativa, que as ratas com lesões, apesar de atacarem muito pouco ou não atacarem, se posicionavam próximas ao ninho quando os machos intrusos se aproximavam dos filhotes, em um comportamento que parecia ser uma tentativa de afastar o macho da ninhada. Isso mostra ainda mais claramente que a fêmea, mesmo com a lesão, pareceu continuar identificando a ameaça representada pelo macho, e, além disso, tentou proteger seus filhotes, mesmo atacando muito pouco o macho intruso. É sabido que a informação sensorial proveniente do macho promove uma ativação feromonal que induz mudanças hormonais e respostas comportamentais através da ativação do órgão vomeronasal, o qual se projeta para o bulbo olfatório acessório (HALPERN; MARTINEZ-MARCOS, 2003). Desse, a maior parte da informação

olfatória chega ao núcleo medial da amígdala - MEA (SCALIA; WINANS, 1975), o qual, por sua vez, se projeta para núcleos hipotalâmicos, como o núcleo pré-óptico medial, núcleo ventromedial e núcleo premamilar ventral (PMv). Apesar da proximidade desse último setor com os núcleos VMHvl e LHAtu, o PMv aparece, nos casos de lesões da HAA, com marcação de proteína Fos semelhante à encontrada nos casos controle, indicando que muito provavelmente o reconhecimento do macho intruso por essa via continua ativo em tais situações. Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que o núcleo pré-mamilar ventral (PMv) deve apresentar papel importante na agressão maternal, pois além de existir um aumento da expressão da proteína Fos no PMv de ratas expostas ao macho intruso, também observamos déficits na agressão realizada por ratas lactantes previamente submetidas a lesões citotóxicas desse núcleo (GUIMARÃES, 2012 (em fase de elaboração))¹. Também nesse trabalho foi observada uma diminuição da ativação da parte ventrolateral do núcleo ventromedial hipotalâmico e da área hipotalâmica lateral tuberal no grupo de ratas lactantes com lesão do PMv, sugerindo que, esses setores hipotalâmicos alvos de projeção desse núcleo podem estar mediando a resposta agressiva maternal.

É importante ressaltarmos que as ratas com lesões, tanto no 1/3 caudal como nos 2/3 caudais da Área Hipotalâmica de Ataque, permaneceram normalmente realizando comportamentos de cuidado com a prole, da mesma forma que as ratas controle. Isso é um fator importante uma vez que a estimulação realizada pelos filhotes sobre as ratas lactantes é um dos requisitos necessários para que as ratas realizem o comportamento agressivo maternal frente a um macho intruso (GAMMIE; LONSTEIN, 2005).

Dessa forma, demonstramos que os estímulos provenientes tanto do macho intruso quanto dos filhotes, que são importantes para o desencadeamento do comportamento agressivo maternal, não são fatores limitantes para o grupo de ratas com lesões, as quais tiveram déficits ou abolição de seus ataques mesmo recebendo essas informações sensoriais.

Em um trabalho recente, Lin et al. (2011) mostrou em camundongos machos que o VMHvl, mas não o LHAtu, é crítico para a expressão do ataque agressivo, e está inativado durante a cópula. Já na fêmea, é sabido que o VMHvl é crítico para a expressão da lordose durante a cópula (SAKUMA; PFAFF, 1980). Postulamos que,

¹ GUIMARÃES, C. C. São Paulo, 2012.

diferentemente do macho, na fêmea a ativação do VMHvl sozinho não deve ser suficiente para induzir o comportamento agressivo, sendo necessário também a ativação concomitante do LHA_{tu}. Além disso, existem indícios de uma possível ativação direta do VMHvl mediada por projeções que recebe do LHA_{tu} (CANTERAS et al., 1994), reforçando a ideia da importância dos dois setores para o comportamento de agressão maternal.

Por fim, com o intuito de compreendermos como o VMHvl e o LHA_{tu} estão envolvidos na expressão do comportamento de agressão maternal, analisamos a densidade de células Fos positivas de setores alvos de projeção do VMHvl e LHA_{tu} que foram correlacionados ao comportamento agressivo em machos, como a área peripeduncular, núcleo subparafascicular, zona incerta ventral e região cuneiforme (ROBERTS; NAGEL, 1996). No entanto, não observamos diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e os grupos com lesão, diferentemente dos resultados encontrados em experimentos com machos. Isso não significa necessariamente que esses setores não tenham participação na elaboração do comportamento agressivo maternal, pois, por exemplo, como já foi mostrado, lesões eletrolíticas da área peripeduncular reduziram a agressividade de ratas lactantes (HANSEN, 1989; HANSEN; FERREIRA, 1986).

Também não encontramos diferença estatística na densidade de células Fos positivas na porção ventrolateral caudal da substância cinzenta periaquedutal (PAGvl) entre o grupo controle e os grupos com lesão, embora exista uma tendência de maior marcação de Fos no grupo 2/3 caudais HAA. Essa tendência pode ser explicada pelo fato desse grupo ter tido o comportamento agressivo abolido, e portanto a rata ter ficado mais próxima de seus filhotes, na posição de cifose, a qual é regulada pela PAGvl caudal (NUMAN, 1994). Também, é sabido que o VMH envia projeções intensas para a PAG (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1994), e portanto a lesão mais extensa pode ter permitido uma maior ativação da PAG (retirada da inibição), a qual pôde inibir tonicamente a agressão maternal. Segundo Lonstein e Stern (1997), lesões pré e pós-parto da área ventrolateral caudal da substância cinzenta periaquedutal diminuíram a latência das ratas para iniciarem o ataque aos intrusos e duplicaram o número de ataques, por retirarem a inibição tônica que essa área exerce sobre a agressão maternal.

Em resumo, nossos resultados sugerem um importante papel do VMHvl e do LHA_{tu} no comportamento agressivo maternal, mas ainda não temos elementos para

saber como seus alvos de projeção podem interferir na expressão deste comportamento.

6 CONCLUSÃO

Nesse trabalho pudemos concluir que as lesões dos setores mais caudais da HAA e lesões que englobam 2/3 da extensão rostro-caudal da HAA prejudicaram o comportamento agressivo maternal, nos levando a inferir que os núcleos VMHvl e LHAtu devem ter um papel importante na execução da agressão maternal. Pelo fato das fêmeas continuarem com o PMv ativo nessas situações, acreditamos que o reconhecimento dos machos intrusos existe, mas as fêmeas simplesmente não os atacam. Sugerindo, portanto, que a HAA, particularmente o VMHvl e LHAtu, tenham um papel crítico para a expressão do comportamento.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

AGRELL, J.; WOLFF, J. O.; YLONEN, H. Counter-strategies to infanticide in mammals: Costs and consequences. **Oikos**, v. 83, p. 507-517, 1998.

ARCHER, J. **The behavioral biology of Aggression**. United Kingdom: Cambridge University Press, 1988.

BHATIA, S. C.; MANCHANDA, S. K.; KAPOOR, B. K.; ANEJA, I. S. Electrical and chemical stimulation of the same hypothalamic loci in relation to aggressive behaviour in cats: a comparison study. **Indian Journal Physiology and Pharmacology**, v. 39, p. 369-376, 1995.

BLANCHARD, D. C.; FUKUNAGA-STINSON, C.; TAKAHASHI, L. K.; FLANNELLY, K. J.; BLANCHARD, R. J. Dominance and aggression in social groups of male and female rats. **Behavioural Processes**, v. 9, p. 31-48, 1984.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Review of Psychology**, v. 39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Behavioral correlates of chronic dominance-subordination relationships of male rats in a seminatural situation. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 14, p. 455-462, 1990.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Aggressive behavior in the rat. **Behavioral Biology**, v. 21, p. 197-224, 1977.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. The organization and modeling of animal aggression. In: BRAIN, P. F.; BENTON, O. **The Biology of Aggression**. Netherlands: Sijthoff & Noordhoff, 1981. p. 529-561.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Anti-predator defensive behaviors in visible burrow system. **Journal of Comparative Psychology**, v. 103, p. 70-82, 1989.

CALHOUN, J. **The ecology and sociology of the Norway rat**. Washington, DC: U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, 1963.

CANTERAS, N. S.; SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Projections of the Ventral Premammillary Nucleus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 324, p. 195-212, 1992.

CANTERAS, N. S.; SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-Leucoagglutinin study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 348, p. 41-79, 1994.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CRAWFORD, S.; BALON, E. K. Cause and effect of parental care in fishes: an epigenetic perspective. In: ROSENBLATT, J.; Snowdon, C. T. **Parental care: evolution, mechanisms, and adaptive significance**. New York: Academic Press, 1996. p. 53-108.

FACTOR, E. M.; MAYER, A. D.; ROSENBLATT, J. S. Peripeduncular nucleus lesions in the rat: I. Effects on maternal aggression, lactation, and maternal behavior during pre-and postpartum periods. **Behavioral Neuroscience**, v. 107, p. 166-185, 1993.

FERREIRA, A.; DAHLOF, L. G.; 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**, v. 101, p. 709-717, 1987.

FLANNELLY, K. J.; KEMBLE, E. D.; BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Effects of septal- forebrain lesions on maternal aggression and maternal care. **Behavioral and Neural Biology**, v. 45, p. 17-30, 1986.

FLANNELLY, K. J.; FLANNELLY, L. Time course of postpartum aggression in rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 101, p. 101-103, 1987.

GAMMIE, S. C. Current models and future directions for understanding the neural circuitries of maternal behaviors in rodents. **Behavioral and Cognitive Neuroscience Review**, v. 4, p. 119-135, 2005.

GAMMIE, S. C.; LONSTEIN, J. S. Maternal aggression. In: RANDY NELSON, R. **Biology of aggression**. Oxford: Oxford University Press, 2005. p. 250-274.

HALASZ, J.; ZELENKA, D.; TOTH, M.; TULOGDI, A.; MIKICS, E.; HALLER, J. Substance P neurotransmission and violent aggression: the role of tachykinin NK(1) receptors in the hypothalamic attack area. **European Journal Pharmacology**, v. 611, p. 35-43, 2009.

HALPERN, M.; MARTINEZ-MARCOS, A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. **Progress in Neurobiology**, v. 70, p. 245-318, 2003.

HANEY, M.; DEBOLD, J. F.; MICZEK, K. A. Maternal aggression in mice and rats toward male and female conspecifics. **Aggressive Behavior**, v. 15, p. 443-453, 1989.

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**, v. 100, p. 64-70, 1986.

HANSEN, S. Medial hypothalamic involvement in maternal aggression of rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, p. 1035-1046, 1989.

KRUK, M. R.; VAN DER POEL, A. M.; MEELIS, W.; HERMANS, J.; MOSTERT, P. G.; MOS, J.; LOHMAN, A. H. M. Discriminant analysis of the localization of aggression-inducing electrode placements in the hypothalamus of male rats. **Brain Research**, v. 260, p. 61–79, 1983.

KRUK, M. R.; VAN DER LAAN, C. E.; MEELIS, W.; PHILLIPS, R. E.; MOS, J.; VAN DER POELA, M. Brain-stimulation induced agonistic behaviour: a novel paradigm in ethopharmacological aggression research. **Progress in Clinical Biology Research**, v. 167, p. 157–177, 1984a.

KRUK, M. R.; VAN DER LAAN, C. E.; MOS, J.; VAN DER POEL, A. M.; MEELIS, W.; OLIVIER, B. Comparison of aggressive behavior induced by electrical stimulation in the hypothalamus of male and female rats. **Progress in Brain Research**, v. 61, p. 303–314, 1984b.

LAMMERS, J. H. C. M.; KRUK M. R.; MEELIS W.; VAN DER POEL A. M. Hypothalamic substrates for brain stimulation-induced attack, teeth-chattering and social grooming in the rat. **Brain Research**, v. 449, p. 311–327, 1988.

LEDESMA, J.; DE LUIS, J. M.; MONTEJO, A. L.; LLORCA, G.; PEREZ-URDANIZ, A. Maternal aggression in human beings. **New Trends in Experimental and Clinical Psychiatry**, v. 4, p. 223-228, 1988.

LEYHAUSEN, P. On the functions of the relative hierarchy of moods. In: LORENZ, K.; LEYHAUSEN, P. **Motivation of human and animal behavior: an ethological view**. New York: Van Nostrand, 1973. p. 144-247.

LIN, D.; BOYLE, M. P.; DOLLAR, P.; LEE, H.; LEIN, E. S.; PERONA, P.; ANDERSON, D. J. Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. **Nature**, v. 470, p. 221-227, 2011.

LONSTEIN, J. S.; STERN, J. M. Role of the midbrain periaqueductal gray in maternal nurturance and aggression: c- Fos and electrolytic lesion studies in lactating rats. **Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 3364- 3378, 1997.

LONSTEIN, J. S.; GAMMIE, S. C. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. **Neuroscience and Behavior Reviews**, v. 26, p. 869-888, 2002.

MOS, J.; OLIVIER, B.; VAN OORSCHOT, R. E.; VAN AKEN, H.; ZETHOF, T. Experimental and ethological aspects of maternal aggression in rats: five years of observations. In: BLANCHARD, R. J.; BRAIN P. F.; BLANCHARD, D. C.; PARMIGIANI, S. **Ethoexperimental approaches to the study of behavior**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. p. 385-398.

NUMAN, M. Maternal Behavior. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p. 221-300.

ROBERTS, W. W.; NAGEL, J. First-order projections activated by stimulation of hypothalamic sites eliciting attack and flight in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 110, p. 509-527, 1996.

ROELING, T. A.; VEENING, J. G.; KRUK, M. R.; PETERS, J. P.; VERMELIS, M. E.; NIEUWENHUYSEN, R. Efferent connections of the hypothalamic "aggression area" in the rat. **Neuroscience**, v. 59, p. 1001-1024, 1994.

SAKUMA Y.; PFAFF D. W. Convergent effects of lordosis-relevant somatosensory and hypothalamic influences on central gray cells in the rat mesencephalon. **Experimental Neurology**, v. 70, p. 269-281, 1980.

SCALIA, F.; WINANS, S. S. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. **Journal of Comparative Neurology**, v. 161, p. 31-55, 1975.

SWANSON, L. W. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. **Brain Research**, v. 886, p. 113-164, 2000.

SWANSON, L. M. **The brain maps**: structure of the rat brain, San Diego: Academic Press, 2004.