

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

LUCIANA COSTA TEODORO

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NO
COMPORTAMENTO MATERNAL E NAS FUNÇÕES NEUROENDÓCRINAS DE
RATAS LACTANTES**

ALFENAS/MG

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

LUCIANA COSTA TEODORO

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NO
COMPORTAMENTO MATERNAL E NAS FUNÇÕES NEUROENDÓCRINAS DE
RATAS LACTANTES**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG.

Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva

Coorientadora: Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis

ALFENAS/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Teodoro, Luciana Costa.

Participação dos receptores purinérgicos P2 no comportamento maternal e nas funções neuroendócrinas de ratas lactantes / Luciana Costa Teodoro. -- Alfenas, MG, 2018.
109 f.

Orientador: Alexandre Giusti Paiva.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico) - Universidade Federal de Alfenas, 2018.

Bibliografia.

1. Receptores purinérgicos P2. 2. Comportamento materno. I. Paiva, Alexandre Giusti. II. Título.

CDD-571.1

LUCIANA COSTA TEODORO

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NO
COMPORTAMENTO MATERNAL E NAS FUNÇÕES NEUROENDÓCRINAS DE
RATAS LACTANTES

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia.

Aprovada em:

Prof. Dr. ADELINA MARTHA DOS REIS
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Assinatura: Adeline MR

Prof. Dr. FABRÍCIO DE ARAÚJO MOREIRA
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Assinatura: Fabricao

Prof. Dr. Silvia Graciela Ruginsk Leitão
Instituição: UNIFAL/MG
Assinatura: SGR Leitão

Prof. Dr. ERNANE TORRES UCHÔA
Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
Assinatura: Ernane Torres Uchôa

Prof. Dr. DANIELE SIRINEU PEREIRA
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
Assinatura: Daniele Sirineu Pereira

*“Dedico esta tese àqueles que sempre
me incentivaram, independente dos obstáculos,
a correr atrás dos meus sonhos, minha FAMÍLIA” .*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a DEUS por me conceder saúde e sabedoria para que eu pudesse seguir sempre em frente, mesmo quando diversos obstáculos e tropeços me dificultavam a caminhar...

A meu pai, que mesmo não estando mais por perto, plantou em nossos corações os maiores ensinamentos que alguém poderia deixar, a semente da bondade e do amor. A minha mãe, que inúmeras vezes deixou de fazer planos de vida para se dedicar a seus filhos e sonhar os nossos sonhos, sempre guerreira e amiga!!

A meu marido, Flávio, que sem o seu apoio, não teria chegado até aqui!! Você foi essencial nesta jornada, pois mesmo com minhas ausências, você sempre esteve ao meu lado. Sei que não foi nada fácil!!

A meus irmãos e sobrinhos, que muitas vezes não entendendo o porquê desta escolha, estiveram me dando força e trazendo muitos momentos de alegria.

A todos os colegas que passaram pelo laboratório, e principalmente, àqueles que se tornaram verdadeiros amigos como Mara, Layla, Ana Cláudia, Ana Laura, Tatiane, Sílvia, Bianca e Wesley. Sem vocês este sonho não poderia se concretizar! Muito obrigada! Vocês sempre farão parte de minha vida!

À amiga Fabiana, que foi a grande incentivadora e colaboradora deste estudo. Muito obrigada por toda a ajuda!

Às irmãs de coração que a vida me trouxe, Ana Cristina e Mara. Muito obrigada pelo companheirismo e pela força!

A todos os professores do departamento, em especial à Profa. Jalile, por compartilhar seus conhecimentos e se dispor a me supervisionar no estágio docente.

Ao técnico do laboratório, José dos Reis, por sua ajuda e carinho com os animais e pelos momentos de descontração.

A todos os docentes do Curso de Fisioterapia, em especial aos coordenadores Leonardo, Carmélia e Juliana. Ao técnico, Luiz Tomaz, que foi um grande

companheiro de trabalho e amigo. À Profa. Maria Betânia e Profa. Eliza (diretoria departamento da Escola de Enfermagem). Muito obrigada por todo o incentivo de vocês!!! Tudo isso somente foi possível porque DEUS colocou pessoas tão humanas e que valorizam o profissional como vocês.

Às funcionárias do laboratório de Fisiologia e da Fisioterapia, que zelaram pela limpeza e organização do laboratório, e, principalmente pelas conversas e incentivos de sempre, em especial D.Zélia, Lena, Michele e Giselda.

“Tudo posso n’Aquele que me fortalece”

(Filipenses 4:13)

RESUMO

O comportamento materno consiste em uma série de comportamentos desempenhados pela mãe que auxiliam no desenvolvimento, no crescimento de seu filhote e na propagação de sua espécie. Estudos prévios têm demonstrado a participação de diversos neurotransmissores e neuromoduladores na modulação deste comportamento. Entretanto, até o momento, não tem sido estabelecida a participação dos receptores purinérgicos P2 no comportamento materno de roedores. Embora já tenha sido encontrada a vasta presença destes receptores P2 no sistema nervoso central e seu envolvimento em diversos processos, incluindo a secreção de neuropeptídeos hipotalâmicos envolvidos na lactação. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a participação destes receptores purinérgicos P2 nas respostas comportamentais (cuidados maternos e agressividade contra o intruso) e neuroendócrinas de ratas lactantes. Para esta avaliação foram utilizadas ratas entre o 6° e 7° dia de lactação submetidas à infusão central de veículo ou antagonistas não seletivo de receptores P2 (Suramin) ou antagonista de receptores P2X (PPADS) ou agonista de receptores P2X (α,β MeATP) 30 minutos antes de iniciar os experimentos. A microinjeção de antagonistas de receptores purinérgicos P2 alterou as respostas neuroendócrinas e comportamentais de ratas lactantes uma vez que reduziu os cuidados maternos assim com a ativação de neurônios em áreas fortemente envolvidas com este comportamento (área pré-óptica medial, bed nucleus da estria terminal e neurônios ocitocinérgicos no núcleo paraventricular e no núcleo supra-óptico); reduziu a concentração plasmática de ocitocina e o consumo de leite pelos filhotes; reduziu o comportamento agressivo assim como a ativação neuronal no núcleo ventromedial do hipotálamo, área hipotalâmica do ataque, área hipotalâmica anterior, amígdala medial e na porção ventro-lateral da substância periaqueductal. Entretanto, nenhuma alteração foi encontrada na atividade locomotora. Nossos resultados sugerem a participação dos receptores purinérgicos P2 nas respostas comportamentais e neuroendócrinas de ratas lactantes.

Palavras-chave: Receptores purinérgicos P2. Comportamento materno. Agressividade materna.

ABSTRACT

Maternal behavior consists of a series of behaviors displayed by the female that specifically support the development, the growth of her offspring and in the propagation of its species. Previous studies have demonstrated the participation of several neurotransmitters and neuromodulators in the modulation of this behavior. However, to date, has not been established the participation of P2 purinergic receptors in maternal behavior in rodents. Although it has already been found the widespread presence of these P2 receptors in the central nervous system and its involvement in various processes, including the secretion of hypothalamic neuropeptides involved in lactation Therefore, the aim of our study was to investigate the participation of P2 purinergic receptors on behavioral (maternal care and aggression against the intruder) and neuroendocrine responses during lactation. For this evaluation, rats between the 6th and 7th day of lactation were used under the central infusion of vehicle or non-selective P2 receptors antagonist (Suramin) or P2X receptors antagonist (PPADS) or P2X receptors agonist (α,β MeATP) 30 minutes before starting the experiments. Microinjection of P2 purinergic receptor antagonists has altered the neuroendocrine and behavioral responses of lactating rats since it reduced maternal care as well as the activation of neurons in areas strongly involved with this behavior (medial preoptic area, bed nucleus of the stria terminalis and oxytocinergic neurons in paraventricular nucleus and in the supraoptic nucleus); reduced plasma oxytocin concentration and milk consumption by pups; reduced aggressive behavior as well as neuronal activation of neurons in the ventromedial hypothalamus, hypothalamic attack area, anterior hypothalamus, medial amygdala and ventrolateral periaqueductal gray. However, no change was found in the assessment of locomotor activity. Our results suggest the participation of purinergic P2 receptors in the behavioral and neuroendocrine responses of lactating rats.

Keywords: P2 purinergic receptors. Maternal behavior. Maternal aggression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática de alguns parâmetros comportamentais desenvolvidos por fêmeas lactantes.....	21
Figura 2 -	Representação esquemática da via de sinalização purinérgica.....	27
Figura 3 -	Representação esquemática dos grupos experimentais para avaliação dos cuidados maternos e da atividade locomotora em ratas lactantes.....	35
Figura 4 -	Representação esquemática dos grupos experimentais para avaliação do comportamento agressivo em ratas lactantes.....	36
Figura 5 -	Campo aberto.....	39
Figura 6 -	Efeito da microinjeção de Suramin nos cuidados maternos.....	48
Figura 7 -	Efeito da microinjeção de Suramin nos comportamentos não-maternais.....	49
Figura 8 -	Efeito da microinjeção de PPADS nos cuidados maternos.....	50
Figura 9 -	Efeito da microinjeção de PPADS nos comportamentos não-maternais.....	51
Figura 10 -	Efeito da microinjeção de α,β -MeATP nos cuidados maternos.....	52
Figura 11 -	Efeito da microinjeção de α,β -MeATP nos comportamentos não-maternais.....	53
Figura 12 -	Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos na MPOA após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.....	55
Figura 13 -	Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos no BNST após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.....	56

Figura 14 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos em neurônios ocitocinérgicos do SON após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.....	57
Figura 15 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos em neurônios ocitocinérgicos do PVN após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.....	58
Figura 16 - Efeito da microinjeção de PPADS na concentração plasmática de ocitocina e no ganho de peso na ninhada.....	59
Figura 17 - Efeito da microinjeção de Suramin no comportamento agressivo.....	61
Figura 18 - Efeito da microinjeção de PPADS no comportamento agressivo.....	62
Figura 19 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos no VMH após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.....	64
Figura 20 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos no AHA após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.....	65
Figura 21 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos na HAA após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.....	66
Figura 22 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos na PAGvl após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.....	67
Figura 23 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais	

	mostrando células positivas para c-Fos na MeA após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.....	68
Figura 24 -	Efeito da microinjeção de Suramin na atividade locomotora.....	69
Figura 25 -	Efeito da microinjeção de PPADS na atividade locomotora.....	70
Figura 26 -	Efeito da microinjeção de α,β -MeATP na atividade locomotora.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito da microinjeção de Suramin ou PPADS sobre o número de células positivas para c-Fos no MPOA, BNST, SON e PVN (MM); número de neurônios ocitocinérgicos no SON e PVN (MM) e; número de células positivas para c-Fos em neurônios ocitocinérgicos do SON e PVN (MM).....	54
Tabela 2 -	Efeito da microinjeção de Suramin ou PPADS sobre o número de células positivas para c-Fos no VMH, AHA, HAA, MPOA, PVN, FPCvo, SLv, PAGvl, CeA e MeA.....	63

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ADP	- Difosfato de adenosina
AHA	- rea hipotalâmica anterior
AMP	- Monofosfato de adenosina
ANOVA	- Análise de variância
Aq	- Aqueduto cerebral
Arq	- Núcleo arqueado
ATP	- Trifosfato de adenosina
ATPyS	- Adenosina 5'-(3-tiotrifosfato)
BNST	- Bed núcleo da estrial terminal
BzATP	- 3'-O-(4-benzoil-benzoil) ATP
CA	- Comissura anterior
Ca⁺²	- íons cálcio
CeA	- Amígdala central
CM	- Comportamento materno
CMT	- Comportamento materno total
CRF	- Fator de liberação de corticotrofina
ELISA	- <i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i>
EPM	- Erro padrão da média
FPCvo	- Córtex pré-frontal ventro-orbital
HAA	- rea hipotalâmica do ataque
HPA	- Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
i.c.v	- Intracerebroventricular
K⁺	- íons potássio
LHA_{tu}	- área hipotalâmica lateral tuberal
MeA	- Núcleo medial da amígdala
MPOA	- rea pré-óptica medial
MM	- Magnocelular medial
Na⁺	- íons sódio
NaCl	- Cloreto de sódio
OT	- Ocitocina
PAG	- Substância cinzenta periaqueductal
PAG_{vl}	- Porção ventro-lateral da substância cinzenta

	periaqueductal
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PPADS	- <i>Pyridoxal 5-phosphate 6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid</i>
PVN	- Núcleo paraventricular
QO	- Quiasma óptico
RNAm	- RNA mensageiro
SL	- Núcleo septal lateral
SLv	- Parte ventral do núcleo septal lateral
SNC	- Sistema nervoso central
SON	- Núcleo supra-óptico
TM_s	- Domínios transmembranas
TM1	- Domínio transmembrana 1
TM2	- Domínio transmembrana 2
TO	- Trato óptico
UDP	- Difosfato de uridina
UTP	- Trifosfato de uridina
VMH	- Núcleo ventromedial do hipotálamo
VL	- Ventrículo lateral
α,β-	- α,β-metileno-adenosina 5'-trifosfato
meATP	
β,γ-	- β,γ-metileno-adenosina 5'-trifosfato
meATP	
2-	- 2-metiloadenosina 5'-trifosfato
MeSATP	
3V	- Terceiro ventrículo

LISTA DE SÍMBOLOS

=	- igual
±	- mais ou menos
<	- menor
/	- por
%	- porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	COMPORTAMENTO MATERNO.....	19
1.2	RECEPTORES PURINÉRGICOS.....	24
1.2.1	Classificação dos receptores purinérgicos.....	25
1.2.2	Agonistas e antagonistas dos receptores purinérgicos.....	26
1.3	RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 E COMPORTAMENTO MATERNO.....	28
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVO	32
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	ANIMAIS.....	33
4.1.1	Acasalamento.....	33
4.1.2	Nascimento e padronização da ninhada.....	33
4.2	DROGAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	34
4.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	35
4.4	CIRURGIAS ESTEREOTÁXICAS.....	36
4.5	MICROINJEÇÕES.....	37
4.6	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	37
4.6.1	Avaliação dos cuidados maternos.....	37
4.6.2	Avaliação do comportamento agressivo.....	38
4.6.3	Avaliação da atividade locomotora no campo aberto.....	39
4.7	IMUNOISTOQUÍMICA PARA C-FOS E FOS-OT.....	40
4.8	COLETA DE SANGUE, DOSAGEM HORMONAL DE OCITOCINA E AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA.....	41
4.9	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	42
4.9.1	Participação dos receptores purinérgicos P2 nos cuidados maternos.....	42
4.9.2	Participação dos receptores purinérgicos P2 na ativação neuronal em regiões envolvidas com o comportamento	

	materno e em neurônios ocitocinérgicos hipotalâmicos.....	42
4.9.3	Participação dos receptores purinérgicos P2 na concentração plasmática de ocitocina em ratas lactantes e no ganho de peso da ninhada.....	43
4.9.4	Participação dos receptores purinérgicos P2 no comportamento agressivo.....	43
4.9.5	Participação dos receptores purinérgicos P2 na ativação neuronal em regiões envolvidas com o comportamento agressivo.....	44
4.9.6	Participação dos receptores purinérgicos P2 na atividade locomotora.....	44
4.10	CONFIRMAÇÃO DA MICROINJEÇÃO NO VENTRÍCULO LATERAL.....	44
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
6	RESULTADOS.....	47
6.1	PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NOS CUIDADOS MATERNAIS.....	47
6.2	PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NA ATIVAÇÃO NEURONAL EM REGIÕES ENVOLVIDAS COM O COMPORTAMENTO MATERNO E EM NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS HIPOTALÂMICOS.....	53
6.3	PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE OCITOCINA EM RATAS LACTANTES E NO GANHO DE PESO DA NINHADA.....	58
6.4	PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO.....	59
6.5	PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NA ATIVAÇÃO NEURONAL EM REGIÕES ENVOLVIDAS COM O COMPORTAMENTO AGRESSIVO.....	62
6.6	PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NA ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	69
7	DISCUSSÃO.....	71
8	CONCLUSÃO.....	84

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
ANEXO A.....	103
ANEXO B.....	104

1 INTRODUÇÃO

A seguir, serão abordados os seguintes temas: Comportamento materno, Receptores purinérgicos e Receptores purinérgicos P2 e Comportamento materno.

1.1 COMPORTAMENTO MATERNO

O comportamento materno (CM) consiste em uma série de respostas ou comportamentos desempenhados pela mãe que auxiliam no desenvolvimento, no crescimento de seu filhote e na propagação de sua espécie (ROSENBLAT; MAYER; SIEGEL, 1985; BRIDGES, 2015).

Esse comportamento é provavelmente o mais importante comportamento social presente em fêmeas da classe mamífero, na qual os filhotes dependem exclusivamente do leite, do aquecimento, da proteção, da defesa e da instrução maternos para alcançarem sua independência (STERN, 1997; BOSH; NEUMANN, 2012).

O CM, em ratas Wistar, *Rattus norvegicus*, ocorre por meio de um contato intenso nos primeiros dias de vida da ninhada, diminuindo, progressivamente conforme aumenta a autonomia dos filhotes, cujo desmame pode ocorrer a cerca de vinte em um dias. Os filhotes, nestes primeiros dias, são desprovidos de pêlos, incapazes de se locomover, incapazes de manter sua própria temperatura e incapazes de enxergar por causa dos olhos fechados, que só se abrem por volta do 10º dia de idade (GUBERNICK; KLOPFER, 1981; MIRANDA-PAIVA et al., 2003).

“Algumas mudanças internas ocorrem na gestação ou no parto que despertam o instinto materno”, perdurando durante o período pós-parto (WEISNER; SHEARD, 1933; NUMAN; WOODSIDE, 2010). Neste contexto, ratas parturientes são imediatamente responsivas aos filhotes, uma vez que o sistema neuroendócrino participa de vários eventos relacionados à gestação, ao parto e à lactação, inclusive ao CM. Deste modo, alterações hormonais como nas concentrações de progesterona, estrógeno, prolactina e ocitocina (OT) que ocorrem neste período

alteram o funcionamento de áreas cerebrais da fêmea lactante, promovendo a motivação maternal e assim, o comportamento maternal propriamente dito (NUMAN, 1994; NUMAN; INSEL, 2003; NUMAN; WOODSIDE, 2010; DOBOLYI; GRATTAN; STOLZENBERG, 2014).

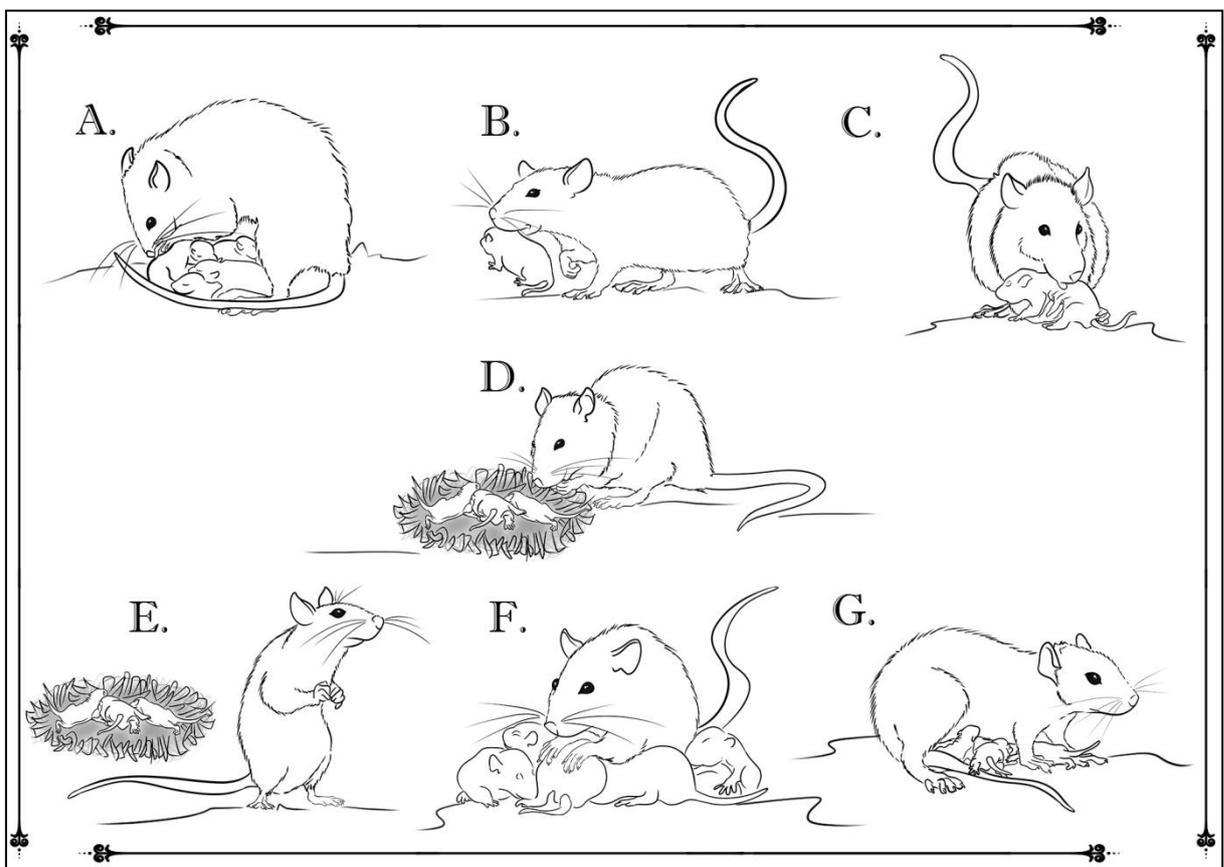
É neste contexto que as ratas lactantes desenvolvem uma série de estratégias de cuidado maternal. Na preparação para o parto, as fêmeas gestantes já desenvolvem comportamentos que objetivam a preparação para os cuidados da ninhada, tais como lambe a própria região mamária a fim de auxiliar no desenvolvimento das glândulas, hiperfagia, agressão contra intrusos bem como a construção do ninho (NUMAN 1994; BRIDGES, 2015).

Imediatamente após o parto, as ratas são estimuladas, pelo contato físico com a prole, a desenvolver respostas maternais que são agrupados em duas categorias: comportamentos diretos e comportamentos indiretos. Os comportamentos diretos observáveis voltados à prole são: busca e o agrupamento dos filhotes (parâmetro indicativo de motivação maternal), o *nursing* que consiste em permanecer sobre os filhotes, aquecendo-os e amamentando-os (MIRANDA-PAIVA et al., 2003), a cifoze que compõe o *nursing* mais ativo e é uma posição que ajuda na amamentação. Durante o *nursing*, é comum ocorrer o *licking/ grooming* nos filhotes que consiste no ato de lambê-los que, por sua vez, não somente mantém os filhotes limpos, mas também estimula a micção e a defecação dos mesmos (BOSH; NEUMANN, 2012).

Toda esta ampla variedade de comportamentos desempenhados pela mãe para assegurar o bem estar e promover o desenvolvimento da prole são enquadrados no termo cuidado materno (BOSH, 2013). Segundo Bosh e Neumann (2012), o *licking/ grooming* e a cifoze constituem parâmetros que caracterizam a qualidade do cuidado materno. Há, portanto, um período ativo caracterizado pela busca e agrupamento dos filhotes, lambida e construção do ninho que precede a quiescência caracterizada pelo *nursing* (LONSTEIN et al., 1998). Esse último chega a ocupar 80% do período do tempo das ratas nos primeiros dias do pós-parto e decai gradualmente, podendo atingir cerca de 25% do tempo na segunda semana (GROTA; ADER, 1969; STERN, 1997).

Entre os comportamentos indiretos realizados pelos roedores voltados à prole, encontra-se a construção do ninho, local que promove área segura para prole na ausência da mãe e onde normalmente se desenvolve o *nursing*; a agressividade contra intrusos; o aumento do consumo alimentar e a diminuição da ansiedade e do medo (HARD; HANSEN, 1985; LONSTEIN, 2005; PEREIRA et al., 2005; BRIDGES, 2015) (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática de alguns parâmetros comportamentais desenvolvidos por fêmeas lactantes.



Fonte: VERONESI, 2016.

Nota: Posição de cifose (A), busca dos filhotes (B), lambendo o filhote (*pup-grooming/licking pups*) (C), construindo o ninho (D), fora do ninho (E), agrupamento dos filhotes (F), posição não arqueada (G).

Entre estes comportamentos indiretos, a agressividade contra intrusos é um comportamento de grande significância adaptativa (CRAWFORD; BALON 1996; LEDESMA et al., 1988). Nesta classe de mamífero, na qual o infanticídio por co-específicos não parentais é bastante comum, o termo agressão materna é apropriado, pois a fêmea lactante pode atacar machos que se aproximam da sua prole a fim de preservar a vida de seus filhotes, sendo assim um comportamento que

tem por objetivo a proteção da ninhada e não uma agressão competitiva que visa adquirir recursos (AGRELL, WOLFF, YLÖNEN, 1998; ARCHER, 1988). Altos níveis de agressividade são encontrados em ratas lactantes durante as duas primeiras semanas após o parto e, após este período, há um declínio deste comportamento embora a lactação continue (GIONEVARO et al., 2000).

O comportamento agressivo desempenhado pelas ratas lactantes contra um macho intruso é similar a de machos dominantes em colônias. Elas apresentam uma sequência de ataque lateral (comportamento ofensivo), estendendo o dorso, tomando uma postura arqueada, embora seja menos frequente do que observado em machos dominantes. A maioria das mordidas de machos dominantes nos intrusos resulta em lesão sendo que as fêmeas dificilmente produzem um dano físico. Outra diferença importante é o alvo destas mordidas. Ao contrário dos machos, uma considerável frequência de mordidas das fêmeas é dirigida a cabeça e a região do focinho do intruso. As fêmeas apresentam o padrão de ataque frontal, o qual não é observado em machos dominantes (BLANCHARD; BLANCHARD, 1990). O ataque frontal é um comportamento súbito, muito rápido, pois não apresenta comportamentos associados como piloereção e/ou dorso arqueado. Esta forma de agressão que ocorre em resposta a uma ameaça ou medo é motivada e geralmente precedida por fugas (BRAIN, 1981).

Neste sentido, este comportamento específico de fêmeas lactantes apresenta componentes defensivo e ofensivo, uma vez que os alvos das mordidas das fêmeas e a ocorrência de ataque frontal sugerem que existe um elemento de defesa ou medo na reação de uma fêmea em direção a um intruso (BLANCHARD; BLANCHARD, 1981; DE ALMEIDA; FERREIRA; AGRATI, 2014) e existe uma forte tendência da fêmea se aproximar e atacar o intruso mesmo antes do mesmo se aproximar do ninho, indicando a natureza ofensiva deste comportamento (OLIVIER; MOS; VAN OORSCHOTOLIVER, 1985).

Uma grande variedade de fatores modula tal comportamento em animais. Entre estes fatores encontram-se as alterações hormonais das mães antes e após o parto; os estímulos, principalmente táteis e olfatórios provenientes dos filhotes; os sinais olfatórios vindo dos intrusos; e o ambiente em que os animais estão situados

(MAYER; ROSENBLATT, 1987; ERSKINE; BARFIELD; GOLDMAN, 1978; FERREIRA; HANSEN, 1986).

Dada a complexidade do CM em roedores, é de se esperar que muitas regiões cerebrais estejam envolvidas neste processo (LONSTEIN et al. 1998). A área pré-óptica medial (MPOA), localizada na porção rostral do hipotálamo, é uma importante região envolvida na regulação do CM em ratos e em outras espécies (NUMAN; WOODSIDE, 2010). Esta região tem sido identificada como um sítio-chave integrativo onde os hormônios como estradiol, hormônios lactogênicos e OT atuam em seus receptores para estimular o início do CM (BRIDGES et al., 1990; BRIDGES et al., 1997; NUMAN; ROSENBLATT; KOMISARUK, 1977; NUMAN; WOODSIDE, 2010; BRIDGES, 2015). Além disso, esta região também recebe estímulos sensoriais vindos dos filhotes, o que promove o fortalecimento da relação mãe-filhote (DOBOLYI et al., 2014). Assim, a MPOA também é importante para a manutenção do CM, uma vez que lesões nesta área rompem ambos, o início e a manutenção deste comportamento (NUMAN; STOLZENBERG, 2009).

Outra região de grande importância no CM é o Bed núcleo da estria terminal (BNST). Doboly e colaboradores (2014) inclui a porção ventral do BNST no termo MPOA porque ambos recebem aferências e desempenham papéis similares no CM em roedores. Além disso, uma clara separação destas áreas não foi encontrada citoarquiteticamente. Neurônios localizados na MPOA/BNST enviam projeções para outras regiões envolvidas na circuitaria neural que regula o CM, podendo controlar a atividade neuronal destas outras regiões e assim modular este comportamento (NUMAN; NUMAN, 1997; STACK et al., 2002).

Além disso, os núcleos paraventricular (PVN) e o supra-óptico (SON) do hipotálamo são essenciais para a lactação, uma vez que secretam o hormônio OT na hipófise posterior em resposta ao estímulo de sucção como parte do reflexo de ejeção do leite. Além da participação na lactação, tem sido demonstrado o envolvimento deste neuropeptídeo na modulação de respostas maternas direcionadas ao filhote, uma vez que o mesmo também é liberado centralmente e atua em redes específicas do cérebro materno (NUMAN; WOODSIDE 2010; DOBOYIL; GRATTAN; STOLZENBERG, 2014). Um dos primeiros estudos que relataram o papel deste neuropeptídeo como estimulador do CM em ratos, utilizou a

infusão central de OT em ratas fêmeas virgens, ovariectomizadas e tratadas previamente com estrógeno. Este tratamento induziu um início rápido do CM (PEDERSEN et al., 1982). Além disso, Insel & Harbaugh (1989) observaram que lesões do PVN rompem o início do CM em ratas primíparas.

Em relação à agressão materna, há poucos relatos na literatura sobre os substratos neurais envolvidos especificamente em tal comportamento (LONSTEIN; GAMMIE, 2002), bem como os mecanismos básicos acerca da agressão materna em fêmeas lactantes (GIOVENARDI et al., 1998; CONSIGLIO, 2005). A maioria dos estudos sobre agressão está relacionada ao comportamento dos machos e sugere que determinadas áreas encefálicas como MPOA, PVN, septo lateral (SL), área hipotalâmica anterior (AHA), núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH), área hipotalâmica do ataque (HAA) núcleos do complexo amigdalóide, substância periaqueductal (PAG) e córtex pré-frontal também estejam envolvidas em tal comportamento (MOTTA et al., 2013; DE ALMEIDA; FERREIRA; AGRATI, 2014).

1.2 RECEPTORES PURINÉRGICOS

A neurotransmissão purinérgica envolvendo a liberação de Trifosfato de Adenosina (ATP) como neurotransmissor foi proposto por Burnstock em 1972. Em 1976, o ATP foi identificado como cotransmissor nos nervos simpáticos e parassimpáticos. Neste mesmo ano, consagrou-se o termo receptor purinérgico (BURNSTOCK, 2007; BURNSTOCK et al., 2011). Entretanto, o grande avanço e a aceitação da sinalização purinérgica somente ocorreu no início dos anos 90, quando os receptores para purinas e pirimidinas foram clonados e caracterizados (BURNSTOCK, 2014).

Há evidências que estes receptores participam tanto na sinalização rápida na neurotransmissão e neuromodulação, bem como na sinalização a longo-prazo (trófica) na proliferação, diferenciação e morte celular. Nos neurônios, os mesmos podem ser encontrados no terminal pré-sináptico assim como na região somato-dendrítica (pós-sináptico) (ABBRACCHIO; CERUTI, 2006; BURNSTOCK et al., 2011).

Recentemente, detectou-se a presença destes receptores em fenótipos não-neuronais, nos mais diversos tecidos. Hoje, sabe-se que a sinalização purinérgica está envolvida em diversos mecanismos como nas secreções endócrinas e exócrinas, resposta imune, dor, inflamação entre outros (GEVER et al., 2006; BURNSTOCK, 2007; NORTH, 2016).

1.2.1 Classificação dos receptores purinérgicos

Atualmente, está bem estabelecida a existência de duas famílias de receptores purinérgicos: Receptores P1 e receptores P2. Os receptores P1 (receptores de adenosina) são receptores acoplados a proteína G e ativados pela adenosina e, em alguns casos, pela inosina; são subdivididos em quatro grupos (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3) (CODDOU et al., 2011; SONG et al., 2011).

A família de receptores P2 é subdividida em receptores P2X e receptores P2Y, baseado em sua forma estrutural e em suas ações farmacológicas. Os receptores P2X são ionotrópicos, ou seja, são proteínas de membrana que formam canais para íons na bicamada lipídica. Estes canais são ativados por ligantes, sendo o ATP o principal agonista. Além disso, são seletivos a cátions, por alguns passam o Na^+ e o K^+ e, outros são permeáveis também ao Ca^{+2} . (CODDOU et al., 2011)

Sete subunidades foram clonadas e sequenciadas (P2X1 a P2X7). Conjectura-se que o canal seja um trímero destas subunidades, e podem ser homoméricos ou heteroméricos (BURNSTOCK, 2007; GEVER et al., 2006). Com a clonagem, foi revelado que subunidades que formam os receptores P2X apresentam uma longa alça extracelular (ectodomínio), dois domínios transmembrana (TM 1 e TM2) e os terminais amino e carboxil localizados intracelularmente (CODDOU et al., 2011).

Assim como os receptores P1, os receptores P2Y são metabotrópicos, ou seja, são receptores acoplados à proteína G. Foram identificados 8 subtipos de receptores (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14) (CODDOU et al., 2011; SONG et al., 2011). Estes receptores podem ser subdivididos

farmacologicamente (de acordo com o tipo de nucleotídeo ao qual respondem); filogenética e estruturalmente (de acordo com a porcentagem de identidade das sequências de aminoácidos ou de acordo com a proteína G com a qual interagem) (ABBRACCHIO et al., 2006). É reconhecido que os receptores P2Y respondem a purinas bem como a pirimidinas; assim o ATP, Difosfato de Adenosina (ADP) e outros nucleotídeos endógenos como Trifosfato de Uridina (UTP), Difosfato de Uridina (UDP) e UDP-glicose atuam como potentes agonistas para receptores P2Y (ABBRACCHIO et al., 2006; CODDOU et al., 2011).

A topologia destes receptores é típica da família de receptores acoplados à proteína G, apresentando sete domínios transmembranas (TMs), terminal amino voltado para o meio extracelular e o terminal carboxil para o meio intracelular. Nos TMs 3, 6 e 7 estão os resíduos de aminoácidos com carga positiva, que formam os sítios de ligação dos nucleotídeos. Provavelmente, estes resíduos interagem com cargas negativas dos grupos fosfatos dos nucleotídeos (ABBRACCHIO et al., 2006).

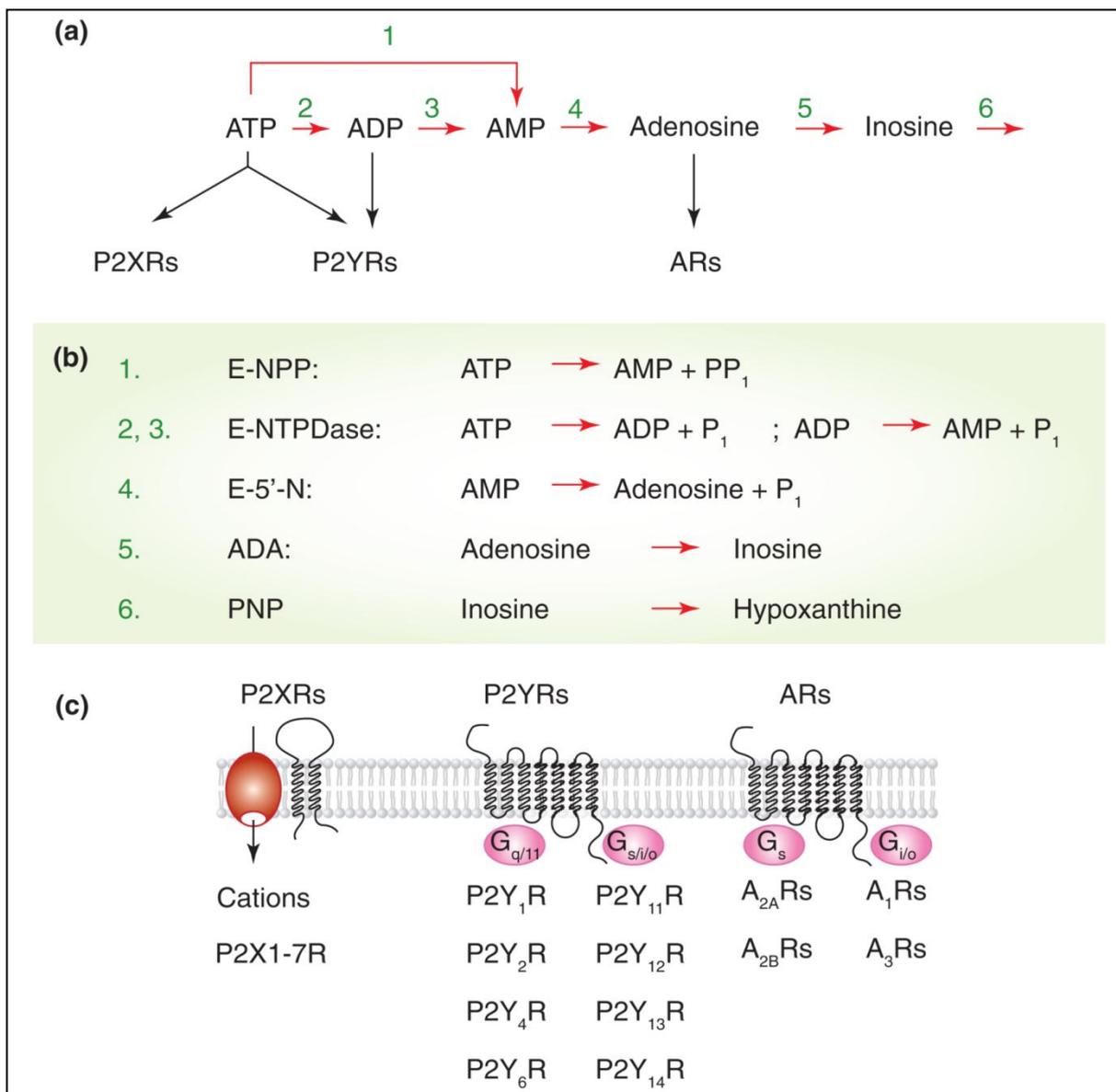
1.2.2 Agonistas e antagonistas dos receptores purinérgicos

O ATP é o principal agonista para receptores purinérgicos P2, atuando em receptores P2X e receptores P2Y. Entretanto, a duração e a distância da atuação deste nucleotídeo são limitadas por várias ectonucleotidases que hidrolizam o ATP em ADP. O ADP também é um potente agonista para receptores P2Y, entretanto, também sofre ação enzimática, sendo hidrolisado em monofosfato de adenosina (AMP). O AMP, por sua vez, é hidrolisado em adenosina que é um potente agonista para receptores P1 (Figura 2). Além disso, outros nucleotídeos também atuam como agonistas para receptores purinérgicos P2Y, apresentando também ação limitada por processos enzimáticos como UTP, UDP, UDP-glicose (STOJILKOVIC, 2009).

Devido às limitações do uso de nucleotídeos, ainda há uma escassez de ferramentas farmacológicas seletivas e potentes para receptores purinérgicos (GEVER et al., 2006). Tem sido difícil desenvolver agonistas específicos para os subtipos de receptores P2X. Os agonistas que existem são análogos do ATP e

atuam em vários receptores P2X com potência e eficácia diferentes. Entre estes se encontram α,β -metileno-adenosina 5'-trifosfato (α,β -meATP), β,γ -metileno-adenosina 5'-trifosfato (β,γ -meATP), 2-metiloadenosina 5'-trifosfato (2-MeSATP), adenosina 5'-(3-tiotrifosfato) (ATP γ S) e 3'-O-(4-benzoil-benzoil) ATP (BzATP) (CODDOU et al., 2011).

Figura 2 - Representação esquemática da via de sinalização purinérgica.



Fonte: STOJILKOVIC, 2009.

Nota: Via de hidrólise dos nucleotídeos (a), enzimas ectonucleotidasas envolvidas na hidrólise dos nucleotídeos (b) e ATP é o agonista para receptores P2X e vários receptores P2Y, ao passo que o ADP é agonista para poucos receptores P2Y e não atua em receptores P2X e a adenosina é o agonista para receptores A (c).

Entre os antagonistas de receptores P2 se encontram as moléculas polianiónicas e os nucleotídeos. Entre as moléculas polianiónicas estão Suramin e análogos, *pyridoxal 5-phosphate 6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid* (PPADS) e análogos; e entre os nucleotídeos estão TNP-ATP, NF279 e RB-2. Recentemente, alguns dos avanços mais significantes na farmacologia purinérgica tem sido o desenvolvimento de antagonistas mais potentes e seletivos para subtipos de receptores. Entretanto, ainda entre os mais utilizados encontram-se a Suramin e o PPADS, por serem drogas que abrangem um amplo espectro de subtipos de receptores P2. A Suramin é uma molécula grande, polissulfonada e complexa, entretanto é um antagonista não-seletivo de receptores P2. Em contrapartida, o PPADS é um antagonista que possui uma especificidade muito elevada por receptores P2X (CODDOU et al., 2011; GEVER et al., 2006).

1.3 RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 E COMPORTAMENTO MATERNO

Há evidências do papel de purinas e pirimidinas em diversos processos, incluindo aprendizagem e memória, sono e alerta, fome, humor e motivação, dor, inflamação (DRIESSEN et al., 1994; KRUEGER et al., 2010; BURNSTOCK et al., 2011; BURNSTOCK, 2016; TSUDA, 2017).

Recentemente, foi demonstrado o envolvimento da adenosina no sistema dopaminérgico mesolímbico modulando o CM (PEREIRA et al., 2011) porém, até o momento, não foi evidenciado a participação do ATP e ADP neste comportamento específico em roedores.

Entretanto, embora não haja estudos demonstrando o envolvimento de receptores purinérgicos P2 no CM, há uma série de estudos neuroanatômicos e neurofisiológicos que sugerem uma possível interação entre o sistema purinérgico e funções neuroendócrinas envolvidas no CM.

Os receptores P2 são expressos por todo o hipotálamo de ratos. Neste contexto, pesquisas utilizando os procedimentos de imunistoquímica, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e hibridização *in situ*, têm demonstrado que múltiplos

receptores e RNAm de receptores P2X e P2Y são expressos em neurônios neurosecretórios envolvidos com a lactação. Deste modo, no núcleo SON foi encontrada a expressão de RNAm para receptores P2X2, P2X3, P2X4, P2X6, P2X7, P2Y1 e P2Y4 (SHIBUYA et al., 1999; SONG; GOMES; STEVENS, 2009; SONG et al., 2011) e de receptores P2X2, P2X4, P2X5, P2X6 e P2Y1 e P2Y4 (SHIBUYA et al., 1999; GUO et al., 2009; SONG; GOMES; STEVENS, 2009; SONG et al., 2011). Além disso, há indícios da expressão de receptores P2Y2 e P2Y6 nos neurônios do SON, uma vez que o mais potente agonista destes receptores apresenta efeito no aumento de cálcio intracelular nesta região (SONG; VIJAYARAGHAVAN; SLADEK, 2007).

No PVN, foi encontrada a expressão de RNAm para receptores P2X3, P2X4, P2Y1 e P2Y4 (SHIBUYA et al., 1999; SONG; GOMES; STEVENS, 2009; SONG et al., 2011) e de receptores P2X1-P2X6, P2Y1 e P2Y4 (GUO et al., 2009; BEJLOBABA; JANJIC; STOJILKOVIC, 2015; SONG; GOMES; STEVENS, 2009; SONG et al., 2011).

Na MPOA, outra região hipotalâmica envolvida com o CM propriamente dito, também foi encontrada expressão de RNAm para receptores P2X4 e P2X6 (COLLO et al., 1996) assim como expressão de receptores P2X2, P2X3, P2X5 e P2Y4 (XIANG et al., 1998; GURIN et al., 2003; XIANG; HE; BURNSTOCK, 2006; SONG et al., 2011).

O BNST, por sua vez também apresentou expressão de RNAm para receptores P2X2, P2X4 e P2X6 (COLLO et al., 1996) e alta expressão de receptores P2X1 e fraca expressão de receptores P2Y4 (FLORENZANO et al., 2008; BURNSTOCK, 2015).

Além da expressão dos diversos subtipos de receptores purinérgicos P2 nestas regiões envolvidas com o CM, também foi evidenciada tal expressão em regiões que modulam o comportamento agressivo em roedores. Neste sentido, foi encontrada a expressão de RNAm para receptores P2X4, P2X6 e P2X7 assim como receptores P2Y4 no SL (YU et al., 2008; COLLO et al., 1996; SONG et al., 2011); RNAm para receptores P2X2, P2X4, P2X6 e P2Y6 assim como receptores P2X2, P2X4, P2X5, P2Y1 e P2Y4 no VMH (BEJLOBABA; JANJIC; STOJILKOVIC, 2015; BURNSTOCK, 2015; COLLO et al., 1996; SONG et al., 2011; STECULORUM et al.,

2015; XIANG; HE; BURNSTOCK, 2006); RNAm para receptores P2X2 assim como receptores P2X1, P2X2, P2Y1 e P2Y4 no núcleo hipotalâmico lateral (GURIN et al., 2003; KITTNER et al., 2006; SONG et al., 2011).

Também foi descrita a presença de receptores P2X1, P2X3, P2X7 e P2Y1 na PAG (DIAZ-HERNANDES et al., 2001; KITTNER et al., 2003; XIAO; LI; SUN, 2015; WORTHINGTON et al., 1999); RNAm para receptores P2X4 e P2X6 assim como receptores P2X1, P2Y1 e P2Y4 na amígdala (KITTNER et al., 2003; SONG et al., 2011; COLLO et al., 1996; FLORENZANO et al., 2008) e; RNAm para receptores P2X4 assim como receptores P2X3, P2X7 e P2Y1 no córtex pré-frontal (GUZMAN; GEREVICH, 2016; BARANOWSKA-BOSIACKA et al., 2016; WENG et al., 2015; PEREIRA et al., 2013).

Além dos estudos neuroanatômicos, há evidências que o ATP extracelular e purinoceptores P2 desempenham importantes papéis no sistema hipotálamo-neurohipofisário uma vez que estudos *in vitro* apontam a participação do ATP na secreção de hormônios hipotalâmicos em ratos (HIRUMA, BOURQUE, 1995; SHIBUYA et al., 1999; SPERLÁGH et al., 1999; SONG; VIJAYARAGHAVAN; SLADEK, 2007; SONG; GOMES; STEVENS, 2009).

Além da participação na secreção hormonal, foi encontrado o envolvimento de purinoceptores tipo P2 em outras funções hipotalâmicas como a regulação da temperatura corporal (GOURINE et al., 2002), controle de ingestão alimentar (KITTNER et al., 2006; STECULORUM et al., 2015; SEILDEL et al., 2006), equilíbrio hidroeletrolítico (MORI; TSUSHIMA; MATSUDA, 1992) e modulação da atividade autonômica simpática (FERREIRA-NETO et al., 2015).

2 JUSTIFICATIVA

Os receptores purinérgicos P2 estão envolvidos na regulação de diversas funções no SNC, entre estas se encontram as alterações comportamentais e a regulação do sistema neuroendócrino. Além disso, técnicas de imunistoquímica, PCR e hibridização *in vitro* têm demonstrado a presença destes receptores purinérgicos em várias regiões centrais que estão fortemente envolvidas com o CM.

Sabendo que os cuidados maternos são essenciais para a sobrevivência da espécie e que não é conhecida a participação destes receptores em tal comportamento e nas funções neuroendócrinas de ratas lactantes, o presente estudo visou ampliar os conhecimentos nesta área, trazendo informações sobre a participação destes receptores nos mecanismos fisiológicos que ocorrem durante o período de lactação e fornecer um melhor entendimento de sua base neurocomportamental para a literatura científica.

Deste modo, a hipótese deste estudo é que os antagonistas de receptores purinérgicos P2, quando administrados via intracerebroventricular, ao reduzir a liberação de neuropeptídeos hipotalâmicos envolvidos na lactação, prejudique o comportamento maternal de ratas lactantes; enquanto a administração do agonista de receptores purinérgicos P2 promova o efeito oposto.

3 OBJETIVO

Para a realização do presente estudo foram traçados objetivo geral e específicos.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação dos receptores purinérgicos P2 no comportamento materno e nas funções neuroendócrinas de ratas lactantes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a participação dos receptores purinérgicos P2 nos seguintes processos:

- Cuidados maternos de ratas lactantes;
- Ativação neuronal em regiões cerebrais envolvidas com o CM e em neurônios ocitocinérgicos hipotalâmicos;
- Concentração plasmática de ocitocina em ratas lactantes e no ganho de peso da ninhada;
- Comportamento agressivo de ratas lactantes;
- Ativação neuronal em regiões cerebrais envolvidas com o comportamento agressivo;
- Atividade locomotora de ratas lactantes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas (Protocolo 511/2013).

4.1 ANIMAIS

Em todos os experimentos foram utilizadas ratas e ratos da linhagem Wistar, pesando de 200 a 250 g, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno adequadas à sua manutenção, tratados com ração comercial e água *“ad libitum”*, mantidos em salas com sistemas de ventilação a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ em ciclo de luz de 12 horas claro-escuro – luzes acesas às 7:00hs.

4.1.1 Acasalamento

Ao final do período claro do dia, ratas que se encontraram no período de transição da fase proestro para estro foram colocadas na gaiola de um rato sexualmente experiente para o acasalamento, na proporção três fêmeas para um macho. Logo no início do período claro do dia seguinte foi realizado o esfregaço vaginal e, confirmando-se a presença de espermatozoides, este foi considerado o primeiro dia de gestação. As ratas prenhas foram colocadas em gaiolas individuais até a ocorrência dos experimentos.

4.1.2 Nascimento e padronização da ninhada

A ocorrência do nascimento foi monitorada diariamente. No segundo dia da lactação, foi realizada a contagem e a sexagem dos filhotes. As ninhadas foram padronizadas para 4 filhotes machos e 4 filhotes fêmeas por mãe. O restante dos filhotes, que não foram utilizados no estudo, foram eutanasiados com anestésico inalantes (Halotano®).

4.2 DROGAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS

Baseado em estudos anteriores (MASAKI et al., 2000; FUKUI et al. 2001), as drogas e soluções utilizadas foram:

Veículo

- Solução Fisiológica (NaCl 0,9%)

Solução administrada no ventrículo lateral (VL) e no volume estabelecido de 5,0 µL.

Antagonistas:

- Suramin (*Suramin sodium salt*, Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA): Antagonista não seletivo de receptores P2.
- PPADS [*Pyridoxal phosphate-6-azo (benzene-2,4-disulfonic acid) tetrasodium salt hydrate*, Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA]: Antagonista de receptores P2X.

Estas drogas foram dissolvidas em salina 0,9%, administradas no VL, no volume de 5,0 µL e nas dosagens de 9,4 µg; 18,8 µg; 37,5 µg e 75,0 µg por animal.

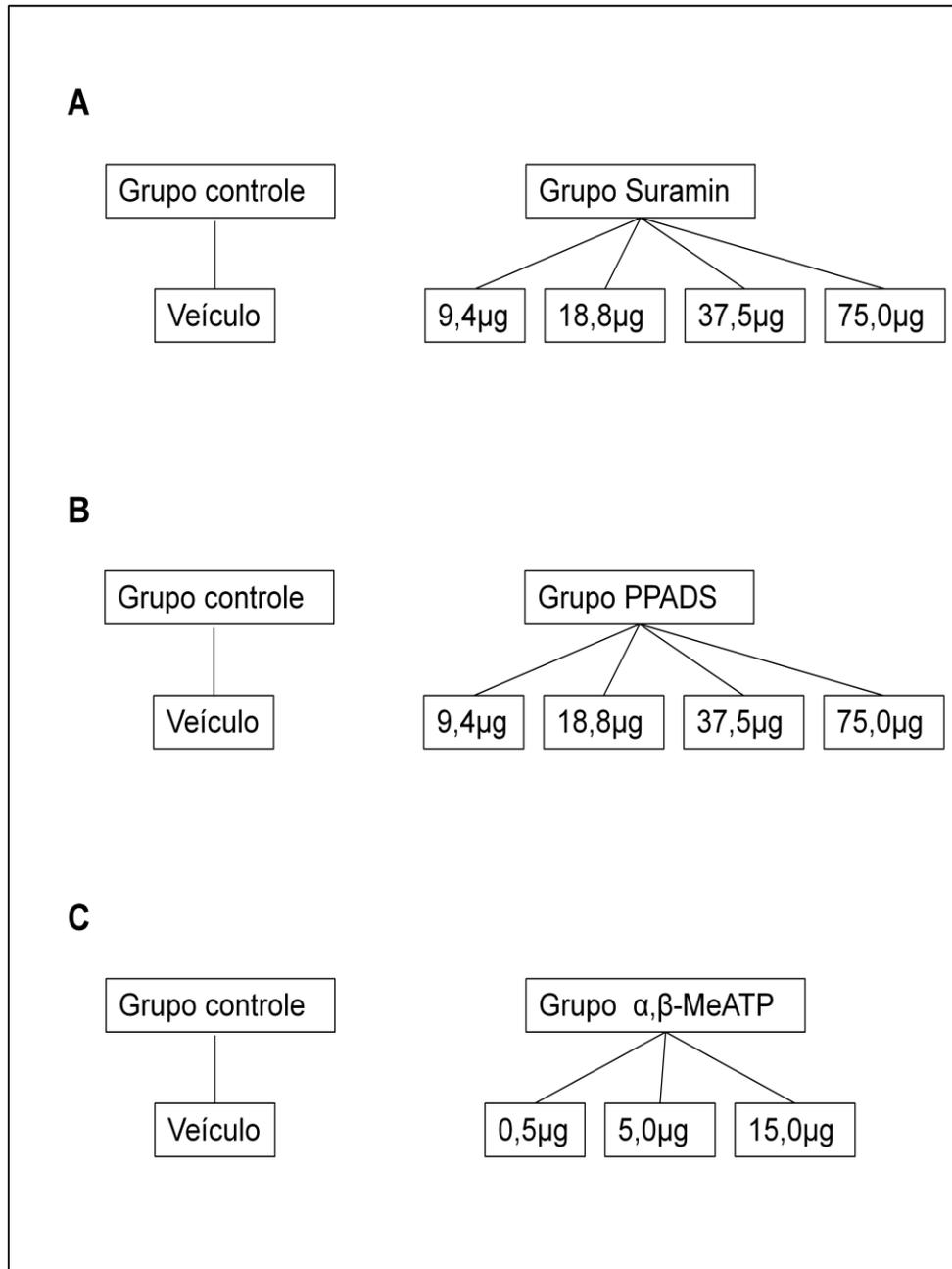
Agonista:

- α,β -MeATP (*α,β -methyleneadenosine 5' triphosphate lithium salt*, Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA): Agonista de receptores P2X .

Esta droga foi dissolvida em salina 0,9%, administrada no VL, no volume de 5,0 µL e nas dosagens de 0,5 µg; 5,0 µg e 15,0 µg por animal.

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

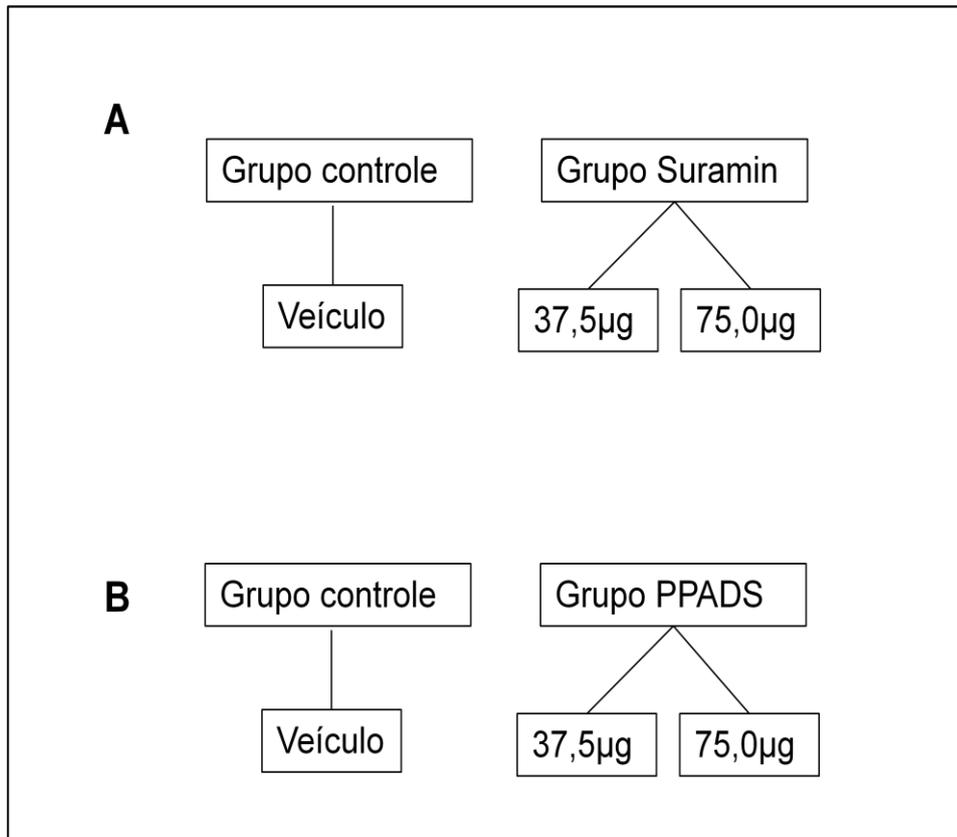
Figura 3 - Representação esquemática dos grupos experimentais para avaliação dos cuidados maternos e da atividade locomotora em ratas lactantes.



Fonte: Da autora.

Nota: Grupo de animais que receberam infusão central da solução veículo ou Suramin nas doses de 9,4 µg; 18,8 µg; 37,5 µg e 75,0 µg por animal (A); Grupo de animais que receberam infusão central da solução veículo ou PPADS nas doses de 9,4 µg; 18,8 µg; 37,5 µg e 75,0 µg por animal (B) e; Grupo de animais que receberam infusão central da solução veículo ou α,β -MeATP nas doses de 0,5 µg; 5,0 µg e 15,0 µg por animal (C).

Figura 4 - Representação esquemática dos grupos experimentais para avaliação do comportamento agressivo em ratas lactantes.



Fonte: Da autora.

Nota: Grupo de animais que receberam infusão central da solução veículo ou Suramin nas doses de 37,5 µg e 75,0 µg por animal (A) e; Grupo de animais que receberam infusão central da solução veículo ou PPADS nas doses de 37,5 µg e 75,0 µg por animal (B).

4.4 CIRURGIAS ESTEREOTÁXICAS

No segundo dia de lactação, as ratas foram anestesiadas com 2,2,2 tribromoetanol 250 mg/kg (Sigma-Aldrich, Brasil) e fixadas em um estereotáxico (Kopf Instruments, Kent, Inglaterra).

Procedimento cirúrgico: a torre do estereotáxico foi angulada em zero e a cabeça do animal ajustada até que o Bregma e o Lâmbda fiquem horizontalizados. Em seguida, uma cânula guia de aço inoxidável (10 mm de comprimento) foi implantada no ventrículo lateral de acordo com as coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Watson (1997) (AP: -0,5 mm, V: -3,6 mm, L: -1,5 mm), tomando-se como

referência o Bregma. A cânula foi fixada ao crânio por meio de parafusos eacrílico dental. Um mandril foi mantido dentro da cânula para prevenir oclusão da cânula e infecção. Após a cirurgia, as ratas receberam injeção subcutânea de analgésico (cetoprofeno, 3 mg por animal) e injeção intramuscular profilática de antibiótico (pentabiótico veterinário pequeno porte, 0,1mL por animal) e permaneceram isoladas até a recuperação da anestesia e posteriormente foram levadas as suas respectivas caixas moradias juntamente com seus filhotes.

4.5 MICROINJEÇÕES

Para a realização da microinjeção no VL, foi utilizada uma seringa Hamilton de 10 µL e uma agulha injetora dental (30G) conectadas por um cateter PE-10, sendo que a agulha injetora foi 2 mm maior que a cânula guia. Todas as microinjeções foram realizadas em um período de 60 segundos e com volume estabelecido de 5,0 µL.

4.6 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

A seguir, serão abordados os testes comportamentais realizados no presente estudo.

4.6.1 Avaliação dos cuidados maternos

Os cuidados maternos foram avaliados no 6º ou 7º dia da lactação no período da manhã. Inicialmente foi anotada a posição do ninho na gaiola moradia. A ninhada foi retirada da gaiola e colocada em caixa aquecida. Após 10-12 horas, os filhotes foram recolocados na gaiola moradia no lado oposto ao ninho inicial e distribuídos de forma não homogênea. Foram então filmados por 30 minutos de acordo com

estudos prévios (CHAMPAGNE et al., 2003; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2011) e, os seguintes comportamentos maternos e não maternos foram analisados:

Comportamentos maternos:

- Porcentagem de tempo em que a rata fica sobre a ninhada em posição arqueada à amamentação (posição arqueada ou cifose);
- Porcentagem de tempo em que a rata fica sobre a ninhada sem estar em posição arqueada;
- Porcentagem de tempo de comportamento materno total (CMT) (tempo em que a rata fica em posição de amamentação sobre os filhotes após 2 minutos de permanência em posição arqueada);
- Latência em segundos para a busca de cada filhote e levá-lo ao ninho;
- Tempo em que a rata lambe os filhotes (*licking pups*).

Comportamentos não-maternos:

- Número de *rearings*;
- Tempo de *self-grooming*.

4.6.2 Avaliação do comportamento agressivo

O comportamento agressivo foi avaliado no 6º ou 7º dia de lactação no período da manhã. Um rato adulto macho jovem (175 -190 g), denominado intruso, foi colocado na caixa moradia, no lado oposto à localização do ninho e filmado por 10 minutos. De acordo com estudos anteriores (BOCCIA; PEDERSEN; 2001; CONSIGLIO; BRIDGES, 2009; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2011; JOHN et al., 2005) foram analisados os seguintes parâmetros:

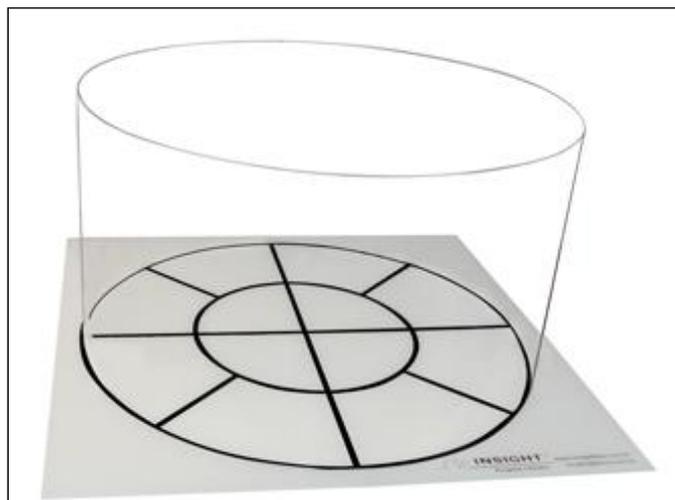
- 1- Latência em segundos para o primeiro ataque;
- 2- Número de ataques frontais;
- 3- Número de ataques laterais;

- 4- Número de ameaças laterais;
- 5- Número de ataques totais;
- 6- Parâmetros maternos (rata sobre os filhotes, tempo de lambida e recuperação dos filhotes).

4.6.3 Avaliação da atividade locomotora no campo aberto

A atividade locomotora foi avaliada no período da manhã no 6º ou 7º dia de lactação. Os animais foram colocados individualmente em uma arena circular de acrílico com diâmetro de 60 cm e paredes com 50 cm de altura, com o piso dividido em quadrantes, dos quais 8 áreas junto às paredes do aparato foram consideradas periferia e as 4 demais centrais (Figura 5). Cada animal foi colocado no centro da arena e filmado por cinco minutos para posterior análise. Foi registrado o número total de cruzamentos (número de entradas com as quatro patas na periferia + número de entradas com as quatro patas no centro). Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 10%.

Figura 5. Campo aberto



Fonte: Insight

4.7 IMUNOISTOQUÍMICA PARA C-FOS E FOS-OT

Após 1 hora e 30 minutos da avaliação dos cuidados maternos ou do comportamento agressivo, as ratas foram anestesiadas com tribromoetanol (250 mg/Kg) e perfundidas através de uma punção intracardíaca com salina (250 mL) contendo 5000U/l de heparina, seguido pela perfusão com fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PBS 0,01 M; 500 mL) sendo posteriormente os cérebros submetidos aos procedimentos imunoistoquímicos detalhados a seguir.

Após sua remoção, os cérebros foram mergulhados em fixador durante 4 horas e em seguida colocados em solução de sacarose a 30% em PBS (0,1 M) a 4°C. Após 48 horas, os cérebros foram seccionados em cortes de 30 µm de espessura utilizando um criostato e coletados em PBS (0,01 M). Imediatamente após, foram realizados o bloqueio da peroxidase endógena (solução de H₂O₂, 1%) por 30 minutos e os cortes foram lavados com PBS (0,01 M) 3 vezes por 5 minutos. Posteriormente, foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com albumina bovina 5% em 0,1 M de PBS durante uma hora. Os cortes foram processados primeiro para imunorreatividade para Fos ficando incubados durante a noite com o anticorpo primário anti-fos de coelho (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) diluído 1:10.000 em PBS (0,1 M) contendo 2% de normal goat serum e 0.3% Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Após lavagem, os cortes foram incubados com segundo anticorpo biotilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA, diluído 1:200 em 1.5% de normal goat serum - PBS) seguido pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Elite, 1:200 em PBS) ambos por 1 hora a temperatura ambiente. Para coloração, foi empregado diaminobenzidina (DAB, Sigma - Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) intensificado com cloreto de cobalto 1% e sulfato de níquel 1%. O produto da reação conferiu uma coloração violeta escuro – preto ao núcleo (FLEMING; WALSH, 1994).

Para a dupla marcação, após a marcação para Fos, os cortes foram incubados por 48 horas a 4°C com anti-OT de coelho (Peninsula Laboratories, Inc., San Carlos, CA, USA, 1:20,000). Posteriormente, os cortes foram lavados e submetidos ao mesmo protocolo descrito para c-Fos utilizando anticorpo biotilado

secundário apropriado seguido pelo complexo avidina-biotina-peroxidase. A cor marrom do citoplasma foi detectada por uma solução de DAB não intensificada.

Por último, os cortes foram montados utilizando Gelatina de Albrecht (1,5% gelatina/álcool 80%). As lâminas foram secas a temperatura ambiente, desidratadas com xileno e cobertas com Entellan.

Todos os núcleos e áreas foram identificados e delimitados de acordo com o atlas Paxinos e Watson (1997). Nos animais submetidos à avaliação dos cuidados maternos foram analisados os seguintes núcleos e áreas: MPOA (coordenada: 0,26 mm posterior ao bregma), BNST (coordenada: 0,20 mm anterior ao bregma), SON (coordenada: 1,30 mm posterior ao bregma), e PVN (coordenada: 1,80 mm posterior ao bregma). Entretanto, nos animais submetidos à avaliação do comportamento agressivo foram analisados os seguintes núcleos e áreas: VMH (coordenada: 2,30 mm posterior ao bregma), AHA (coordenada: 1,80 mm posterior ao bregma), HAA (coordenada: 2,56 mm posterior ao bregma), MPOA (coordenada: 0,26 mm posterior ao bregma), PVN (coordenada: 1,80 mm posterior ao bregma), córtex pré-frontal ventro-orbital (FPCvo) (coordenada: 3,70 mm anterior ao bregma), septo lateral porção ventral (SLv) (coordenada: 0,70 mm anterior ao bregma), substância periaqueductal porção ventro-lateral (PAGvl) (coordenada: 8,00 mm posterior ao bregma), amígdala central (CeA) (coordenada: 2,80 mm posterior ao bregma) e amígdala medial (MeA) (coordenada: 2,80 mm posterior ao bregma). As células positivas para c-Fos foram quantificadas com auxílio de um microscópio Nikon modelo H55L.

4.8 COLETA DE SANGUE, DOSAGEM HORMONAL DE OCITOCINA E AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA.

A coleta de sangue foi realizada no 6° ou 7° dia de lactação. Quinze minutos após a rata lactante expressar o CMT, as mesmas foram decapitadas, o sangue foi coletado do tronco (5 mL), em tubos plásticos, mantidos sob gelo e contendo heparina. O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, 4°C, 15 min.) e as alíquotas mantidas a -20°C até o momento da dosagem hormonal.

Para a dosagem hormonal foi realizada a técnica de ELISA (*Enzime-linked Immunoabsorbent Assay*) através do kit específico (*Oxytocin ELISA kit*, Enzo Life Sciences, NY, USA), segundo as instruções do fabricante.

Para a avaliação do ganho de peso, a ninhada de 8 filhotes foi separada e colocada em uma caixa aquecida (~30°C). Após 10-12 horas de separação materna, massageou-se manualmente a bexiga dos filhotes para eliminação de urina, pesou-se a ninhada e a mesma foi recolocada na caixa moradia. Após 15 minutos de amamentação a ninhada foi pesada novamente para a determinação do ganho de peso (VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2011; PEREIRA et al., 2015).

4.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

A seguir serão abordados os protocolos experimentais realizados no presente estudo.

4.9.1 Participação dos receptores purinérgicos P2 nos cuidados maternos

Para a realização deste protocolo foram utilizadas ratas no 6° ou 7° dia de lactação que receberam infusão central aguda de veículo ou antagonista de receptores purinérgicos (Suramin/ PPADS) ou de agonista (α,β MeATP). Após 30 minutos da administração do veículo ou da droga, os filhotes que inicialmente foram submetidos à separação materna foram recolocados na gaiola moradia no lado oposto ao ninho inicial e então filmados por 30 minutos para a análise dos cuidados maternos de acordo com o procedimento descrito anteriormente (4.6.1).

4.9.2 Participação dos receptores purinérgicos P2 na ativação neuronal em regiões envolvidas com o comportamento materno e em neurônios ocitocinérgicos hipotalâmicos

Ratas submetidas aos procedimentos do protocolo 4.9.1 foram anestesiadas com tribromoetanol (250 mg/Kg; i.p.) 1 hora e 30 minutos após o registro do CM, e em seguida perfundidas através de uma punção intracardíaca com salina (250 mL) contendo 5000U/l de heparina, seguido pela perfusão com fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (500 mL). Ao final, os encéfalos foram removidos, armazenados em paraformaldeído 4% por 4 horas, e posteriormente armazenados em solução de sacarose a 30% até a realização dos procedimentos imunistoquímicos descritos anteriormente (4.7).

4.9.3 Participação dos receptores purinérgicos P2 na concentração plasmática de ocitocina em ratas lactantes e no ganho de peso da ninhada

Para a realização deste protocolo foram utilizadas ratas no 6° ou 7° dia de lactação que receberam infusão central aguda de veículo ou antagonista de receptores P2X (PPADS). Após 30 minutos da administração do veículo ou do antagonista na fêmea lactante, os filhotes que inicialmente foram submetidos à separação maternal por 12 horas, foram recolocados no ninho na caixa moradia. Após 15 minutos de expressar CMT, as ratas foram decapitadas e o sangue foi coletado para a dosagem hormonal de OT de acordo com o procedimento descrito anteriormente (4.8).

Para a avaliação do ganho de peso da ninhada, os filhotes das ratas-mãe utilizadas para a coleta de sangue, tiveram sua bexiga massageada manualmente para eliminação de urina. A ninhada foi pesada antes e após o período de amamentação de 15 minutos de acordo com o procedimento descrito anteriormente (4.8).

4.9.4 Participação dos receptores purinérgicos P2 no comportamento agressivo

Para a realização deste protocolo foram utilizadas ratas no 6° ou 7° dia de lactação que receberam infusão central aguda de veículo ou antagonista de receptores purinérgicos (Suramin/ PPADS). Após 30 minutos da administração do veículo ou da droga, o rato intruso foi colocado na gaiola moradia no lado oposto ao ninho inicial e então filmados por 10 minutos para a análise do comportamento agressivo de acordo com o procedimento descrito anteriormente (4.6.2).

4.9.5 Participação dos receptores purinérgicos P2 na ativação neuronal em regiões envolvidas com o comportamento agressivo

Ratas submetidas aos procedimentos do protocolo 4.9.4 foram anestesiadas com tribromoetanol (250 mg/Kg; i.p.) 1 hora e 30 minutos após o registro do CM, e em seguida perfundidas através de uma punção intracardíaca com salina (250 mL) contendo 5000U/l de heparina, seguido pela perfusão com fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (500 mL). Ao final, os encéfalos foram removidos, armazenados em paraformaldeído 4% por 4 horas, e posteriormente armazenados em solução de sacarose a 30% até a realização dos procedimentos imunistoquímicos descritos anteriormente (4.7).

4.9.6 Participação dos receptores purinérgicos P2 na atividade locomotora

Para a realização deste protocolo foram utilizadas ratas no 6° ou 7° dia de lactação que receberam infusão central aguda de veículo ou antagonista de receptores purinérgicos (Suramin/ PPADS) ou de agonista (α,β MeATP). Após 30 minutos da administração do veículo ou da droga, os animais foram colocados no aparato do campo aberto e então filmados por 5 minutos para posterior análise da atividade locomotora de acordo com o procedimento descrito anteriormente (4.6.3).

4.10 CONFIRMAÇÃO DA MICROINJEÇÃO NO VENTRÍCULO LATERAL

No final dos experimentos, todas as ratas que não foram submetidas à perfusão para a extração do cérebro para os procedimentos imunohistoquímicos, foram submetidas à microinjeção da solução azul de Evans 2% no VL pelos mesmos procedimentos descritos para a microinjeção de drogas ou solução veículo. Logo após, as ratas foram decapitadas, o cérebro foi removido e foi verificado se a microinjeção atingiu o VL. Todos os animais cuja microinjeção não atingiu o ventrículo lateral foram excluídos deste estudo.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o software GraphPad versão 5.0 e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para análise de dados, foi realizada análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de *Neuman-Keuls*. Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS

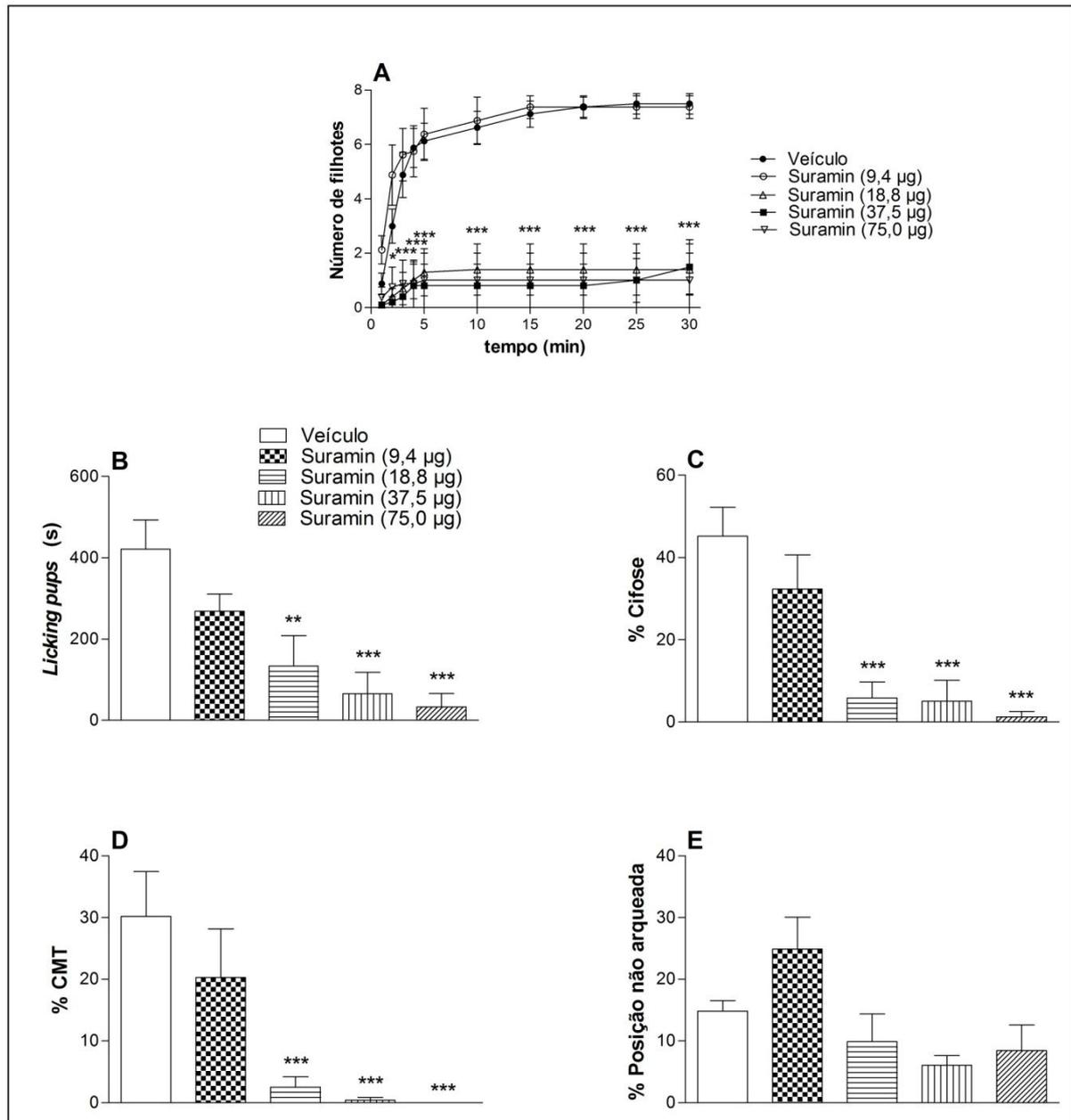
A seguir, serão apresentados os resultados obtidos no presente estudo.

6.1 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NOS CUIDADOS MATERNAIS

A análise dos cuidados maternos demonstrou que administração aguda do antagonista não seletivo de receptores purinérgicos P2 (Suramin) em ratas lactantes prejudicou a busca dos filhotes para a construção do ninho nas doses 18,8 µg, 37,5 µg e 75,0 µg em relação ao grupo controle (Figura 6A). Além disso, a administração central de Suramin nas doses 18,8 µg, 37,5 µg e 75,0 µg reduziu o tempo em que a rata lambe os filhotes ($F_{4,42} = 6,85$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente; Figura 6B); reduziu a porcentagem de tempo em que a rata fica sobre a ninhada em posição de cifose ($F_{4,42} = 12,12$; $p < 0,001$, $p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente; Figura 6C) e diminuiu a porcentagem de CMT ($F_{4,42} = 8,93$; $p < 0,001$, $p < 0,001$ e $p < 0,001$ respectivamente; Figura 6D) em relação ao grupo controle. Enquanto a infusão deste antagonista não interferiu na porcentagem de permanência sobre os filhotes ($F_{4,42} = 3,77$; $p > 0,05$; Figura 6E).

Com relação aos parâmetros não-maternais, nenhuma alteração foi encontrada no tempo de *self grooming* ($F_{4,42} = 0,14$; $p = 0,96$; Figura 7A) e no número de *rearings* com a administração do antagonista não seletivo de receptores purinérgicos P2 ($F_{4,42} = 1,96$; $p = 0,11$; Figura 7B).

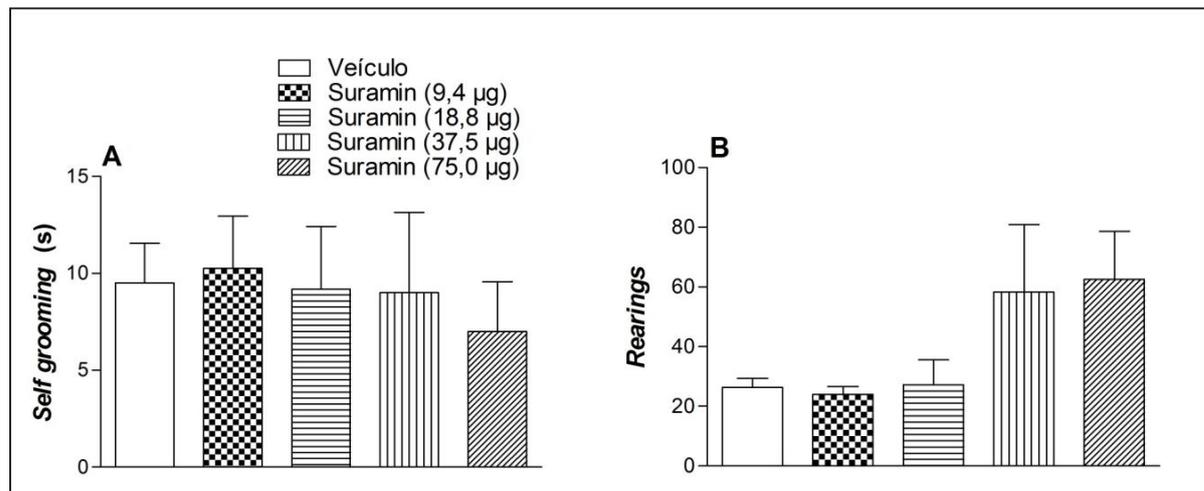
Figura 6 - Efeito da microinjeção de Suramin nos cuidados maternos.



Fonte: Da autora

Nota: Recuperação dos filhotes para a construção do ninho (A), tempo em segundos de *licking pups* (B), porcentagem de permanência na posição de cifose (C), porcentagem de comportamento materno total (D) e porcentagem de permanência sobre os filhotes (E) após a microinjeção da solução veículo ou Suramin nas doses de 9,4 µg, 18,8 µg, 37,5 µg e 75,0 µg (i.c.v) em ratas lactantes. Valores expressos como média ± EPM (n=8-10 animais por grupo). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 quando comparado com o grupo controle.

Figura 7 - Efeito da microinjeção de Suramin nos comportamentos não-maternais.



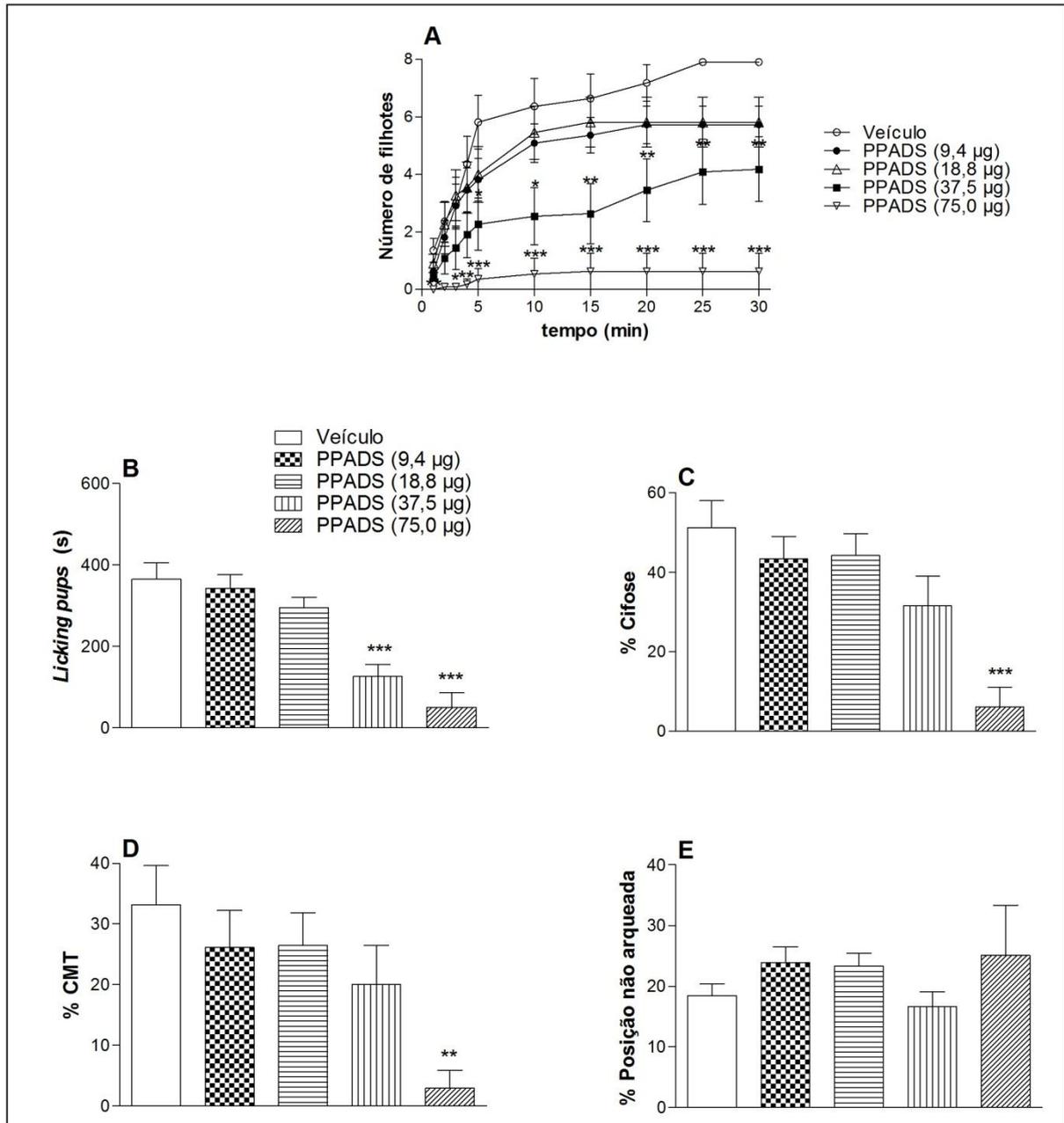
Fonte: Da autora

Nota: Tempo em segundos de *self grooming* (A) e o número de *rearings* (B) após a microinjeção da solução veículo ou Suramin nas doses de 9,4 µg, 18,8 µg, 37,5 µg e 75,0 µg (i.c.v) em ratas lactantes (n=8-10 animais por grupo).

A administração aguda do antagonista específico de receptores purinérgicos P2X (PPADS) em ratas lactantes prejudicou a busca dos filhotes para a construção do ninho nas doses 37,5 µg e 75,0 µg em relação ao grupo controle (Figura 8A). Além disso, a administração central de PPADS nas doses 37,5 µg e 75,0 µg reduziu o tempo em que a rata lambe os filhotes ($F_{4,54} = 17,01$; $p < 0,001$ e $p < 0,001$ respectivamente; Figura 8B) quando comparado com o grupo controle. A administração central de PPADS na dose de 75,0 µg reduziu a porcentagem de tempo em que a rata fica sobre a ninhada em posição de cifose ($F_{4,54} = 8,60$; $p < 0,001$; Figura 8C) e diminuiu a porcentagem de CMT ($F_{4,54} = 4,19$; $p < 0,01$; Figura 8D) quando comparado com os animais do grupo controle. Enquanto a infusão de PPADS não interferiu na porcentagem de permanência sobre os filhotes ($F_{4,54} = 0,76$; $p = 0,55$; Figura 8E).

Com relação aos parâmetros não-maternais, nenhuma alteração foi encontrada no tempo de *self grooming* ($F_{4,54} = 2,19$; $p = 0,08$; Figura 9A) e o número de *rearings* com a administração do antagonista específico de receptores purinérgicos P2X ($F_{4,54} = 0,54$; $p = 0,70$; Figura 9B).

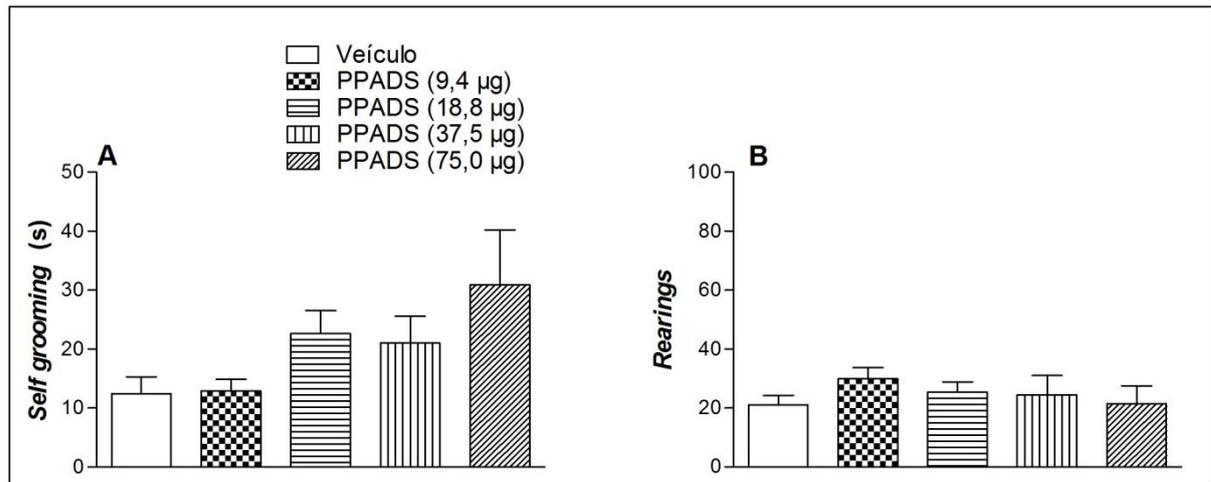
Figura 8 - Efeito da microinjeção de PPADS nos cuidados maternos.



Fonte: Da autora

Nota: Recuperação dos filhotes para a construção do ninho (A), tempo em segundos de *licking pups* (B), porcentagem de permanência na posição de cifose (C), porcentagem de comportamento materno total (D) e porcentagem de permanência sobre os filhotes (E) após a microinjeção da solução veículo ou PPADS nas doses de 9,4 µg, 18,8 µg, 37,5 µg e 75,0 µg (i.c.v) em ratas lactantes. Valores expressos como média ± EPM (n=11 animais por grupo). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 quando comparado com o grupo controle.

Figura 9 - Efeito da microinjeção de PPADS nos comportamentos não-maternais.



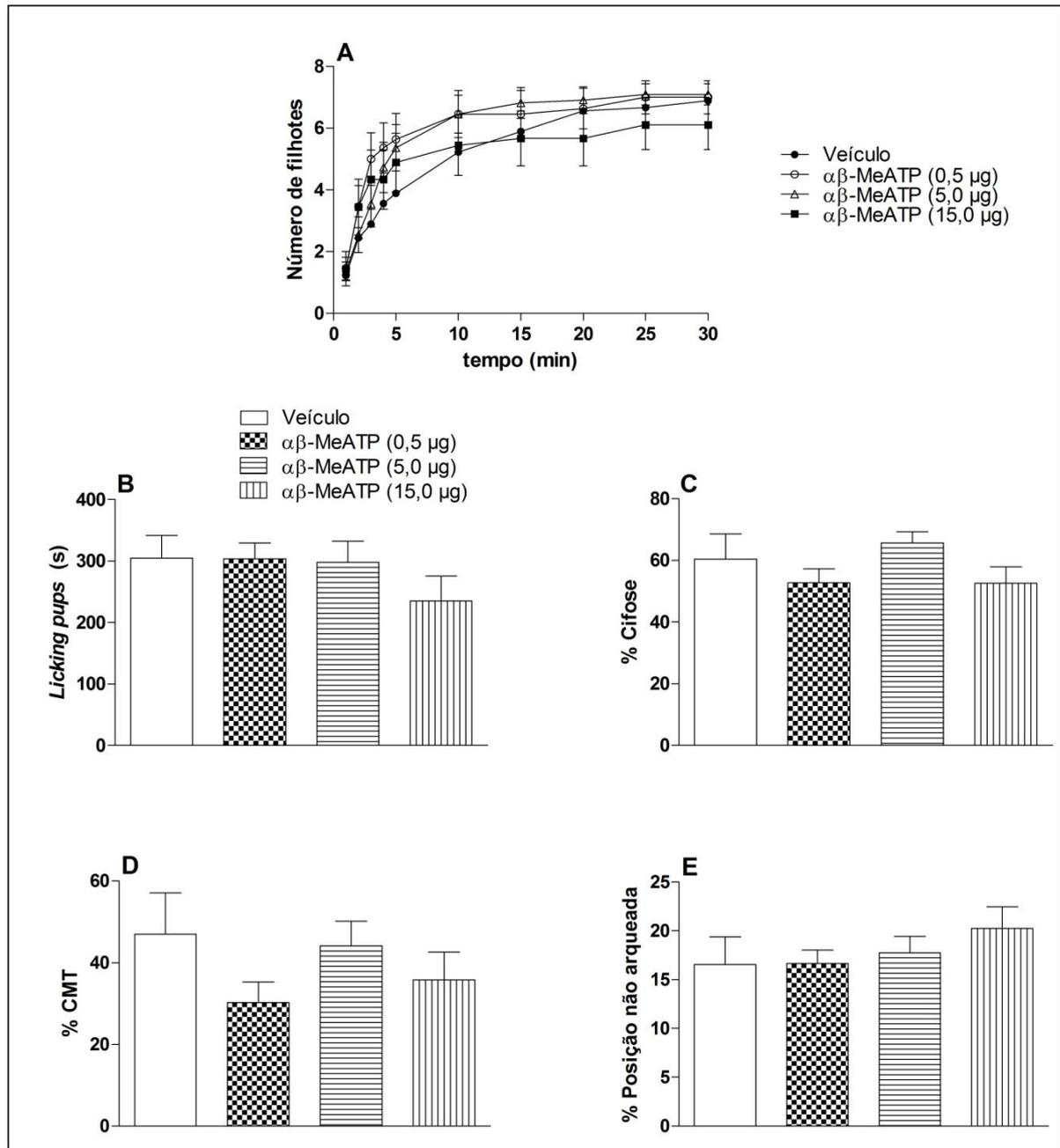
Fonte: Da autora

Nota: Tempo em segundos de *self grooming* (A) e o número de *rearings* (B) após a microinjeção da solução veículo ou PPADS nas doses de 9,4 µg, 18,8 µg, 37,5 µg e 75,0 µg (i.c.v) em ratas lactantes (n=11 animais por grupo).

A administração aguda do agonista de receptores P2X (α,β -MeATP) não alterou a busca dos filhotes para a construção do ninho (Figura 10A), o tempo em que a rata lambe os filhotes ($F_{3,38}= 0,90$; $p=0,45$; Figura 10B); a porcentagem de tempo em que a rata fica sobre a ninhada em posição de cifose ($F_{3,38}= 1,43$; $p=0,24$; Figura 10C), a porcentagem de CMT ($F_{3,38}= 1,17$; $p=0,33$; Figura 10D); e a porcentagem de permanência sobre os filhotes em relação ao grupo controle ($F_{3,38}= 0,67$; $p=0,57$; Figura 10E).

Além disso, a administração de α,β -MeATP (i.c.v) também não interferiu nos parâmetros não-maternais. Assim, nenhuma alteração foi encontrada no tempo de *self grooming* ($F_{3,38}= 0,91$; $p=0,44$; Figura 11A) e no número de *rearings* com a administração do agonista de receptores P2X em relação ao grupo controle ($F_{3,38}= 1,95$; $p=0,13$; Figura 11B).

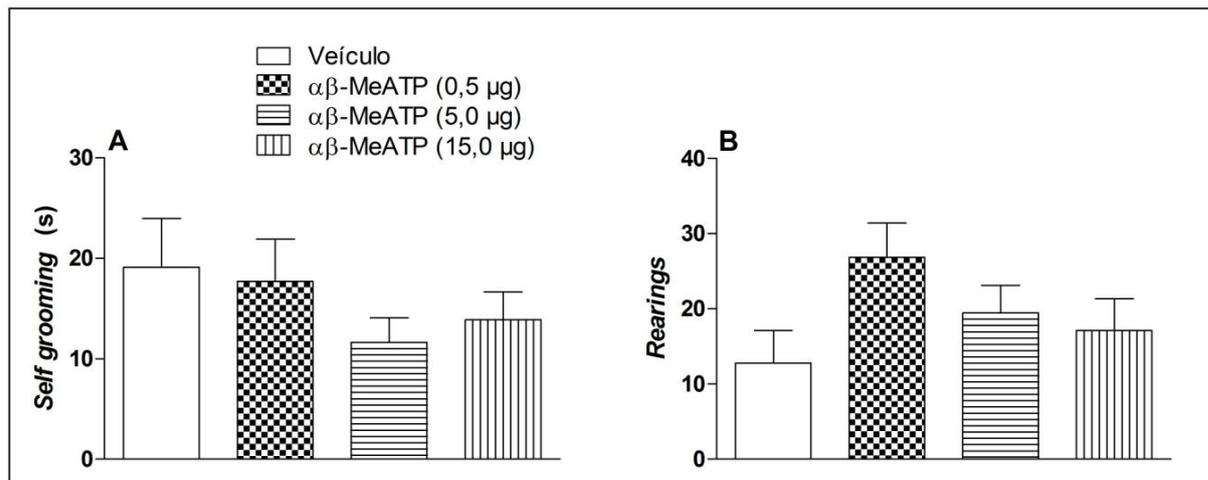
Figura 10 - Efeito da microinjeção de α,β -MeATP nos cuidados maternos.



Fonte: Da autora

Nota: Recuperação dos filhotes para a construção do ninho (A), tempo em segundos de *licking pups* (B), porcentagem de permanência na posição de cifose (C), porcentagem de comportamento materno total (D) e porcentagem de permanência sobre os filhotes (E) após a microinjeção da solução veículo ou α,β -MeATP nas doses de 0,5 μg , 5,0 μg e 15,0 μg (i.c.v) em ratas lactantes (n=9-11 animais por grupo).

Figura 11 - Efeito da microinjeção de α,β -MeATP nos comportamentos não-maternais.



Fonte: Da autora

Nota: Tempo em segundos de *self grooming* (A) e o número de *rearings* (B) após a microinjeção da solução veículo ou α,β -MeATP nas doses de 0,5 μg , 5,0 μg e 15,0 μg (i.c.v) em ratas lactantes (n=9-11 animais por grupo).

6.2 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NA ATIVAÇÃO NEURONAL EM REGIÕES ENVOLVIDAS COM O COMPORTAMENTO MATERNO E EM NEURÔNIOS OCITOCINÉRGICOS HIPOTALÂMICOS

Na tabela 1 pode-se observar que a microinjeção de Suramin ou PPADS (dose de 37,5 μg) reduziu o número de células positivas para c-Fos na MPOA ($F_{2,27}= 9,91$; $p<0,01$ e $p<0,001$ respectivamente; Figura 12), no BNST ($F_{2,30}= 18,01$; $p<0,01$ e $p<0,001$ respectivamente; Figura 13) e no SON ($F_{2,31}= 6,13$; $p<0,05$ e $p<0,05$ respectivamente; Figura 14) em relação ao grupo controle. A microinjeção de PPADS reduziu o número de células positivas para c-Fos no PVN ($F_{2,31}= 5,01$; $p<0,01$; Figura 15) em relação ao grupo que recebeu a infusão da solução veículo.

Além disso, o tratamento com Suramin ou PPADS reduziu o número de células positivas para c-Fos nos neurônios ocitocinérgicos do PVN ($F_{2,31}= 8,39$; $p<0,01$ e $p<0,01$ respectivamente; Figura 15) e do SON ($F_{2,31}= 7,90$; $p<0,01$ e $p<0,01$ respectivamente; Figura 14) quando comparada com o grupo controle .

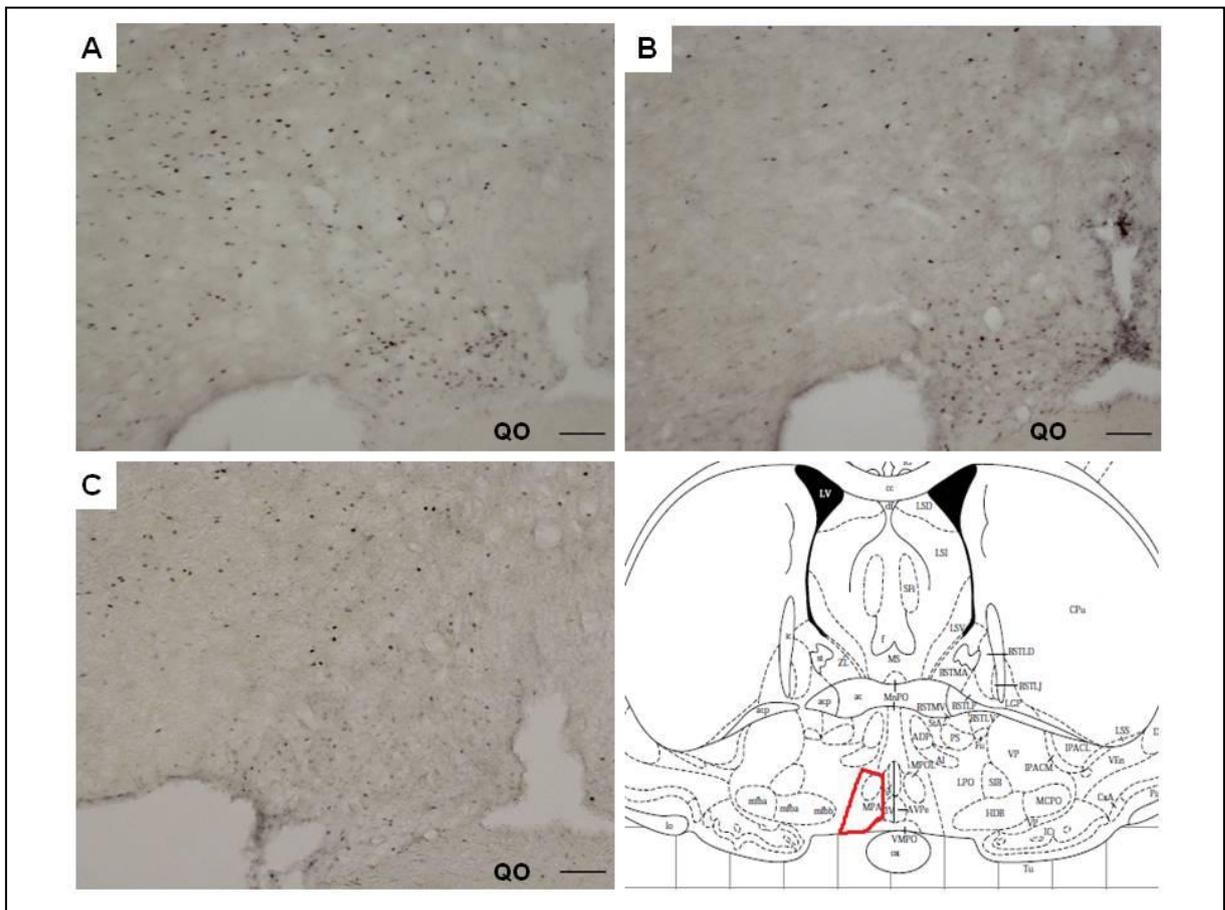
Tabela 1 - Efeito da microinjeção de Suramin ou PPADS na dose de 37,5 µg sobre o número de células positivas para c-Fos no MPOA, BNST, SON e PVN (MM); número de neurônios ocitocinérgicos no SON e PVN (MM) e; número de células positivas para c-Fos em neurônios ocitocinérgicos do SON e PVN (MM).

	Veículo	Suramin	PPADS
c-Fos			
MPOA	147,9 ± 12,8	84,4 ± 11,0**	69,4 ± 9,3***
BNST	64,5 ± 6,1	38,1 ± 6,0**	21,0 ± 2,9***
SON	11,2 ± 1,9	4,2 ± 1,6*	3,8 ± 1,5*
PVN (MM)	16,5 ± 2,8	10,5 ± 2,8	5,4 ± 1,5**
Neurônios OT			
SON	55,7 ± 2,5	41,4 ± 2,3	60,8 ± 2,5
PVN (MM)	63,3 ± 2,3	62,5 ± 1,4	67,5 ± 4,0
c-Fos/OT			
SON	4,1 ± 0,6	1,1 ± 0,4**	0,7 ± 0,3**
PVN (MM)	3,3 ± 0,4	1,1 ± 0,4**	0,6 ± 0,2**

Fonte: Da autora

Nota: MPOA área pré-óptica medial, BNST bed nucleus da estriar terminal, SON núcleo supra-óptico e PVN (MM) região magnocelular do núcleo paraventricular. Valores expressos em média ± EPM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 quando comparado com o grupo controle.

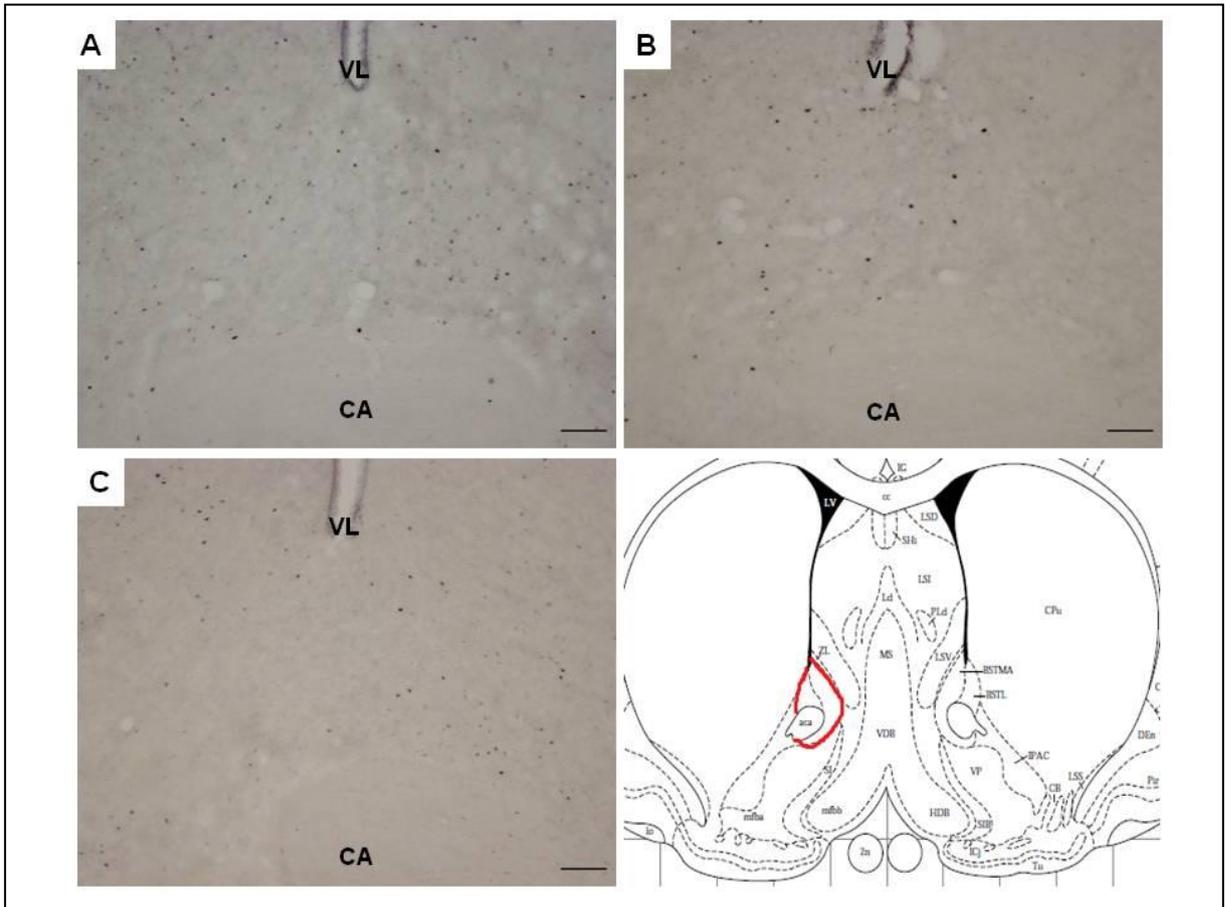
Figura 12 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos na MPOA após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.



Fonte: Da autora

Nota: MPOA área pré-óptica medial. Fotomicrografias no aumento de 10x. Escala de 100 μ m. QO: quiasma óptico.

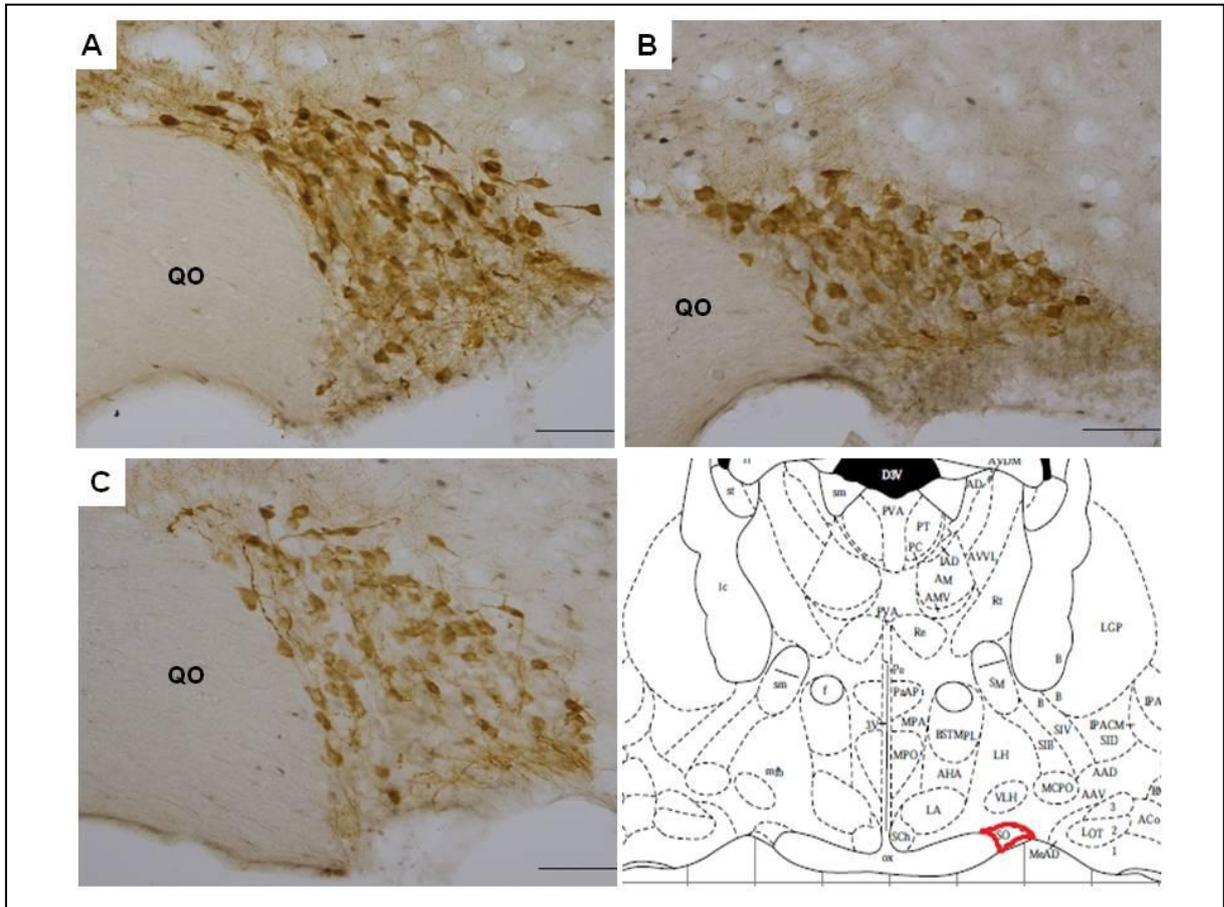
Figura 13 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos no BNST após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.



Fonte: Da autora

Nota: BNST bed nucleus da estria terminal. Fotomicrografias no aumento de 10x. Escala de 100 μ m.
CA: comissura anterior; VL: ventrículo lateral.

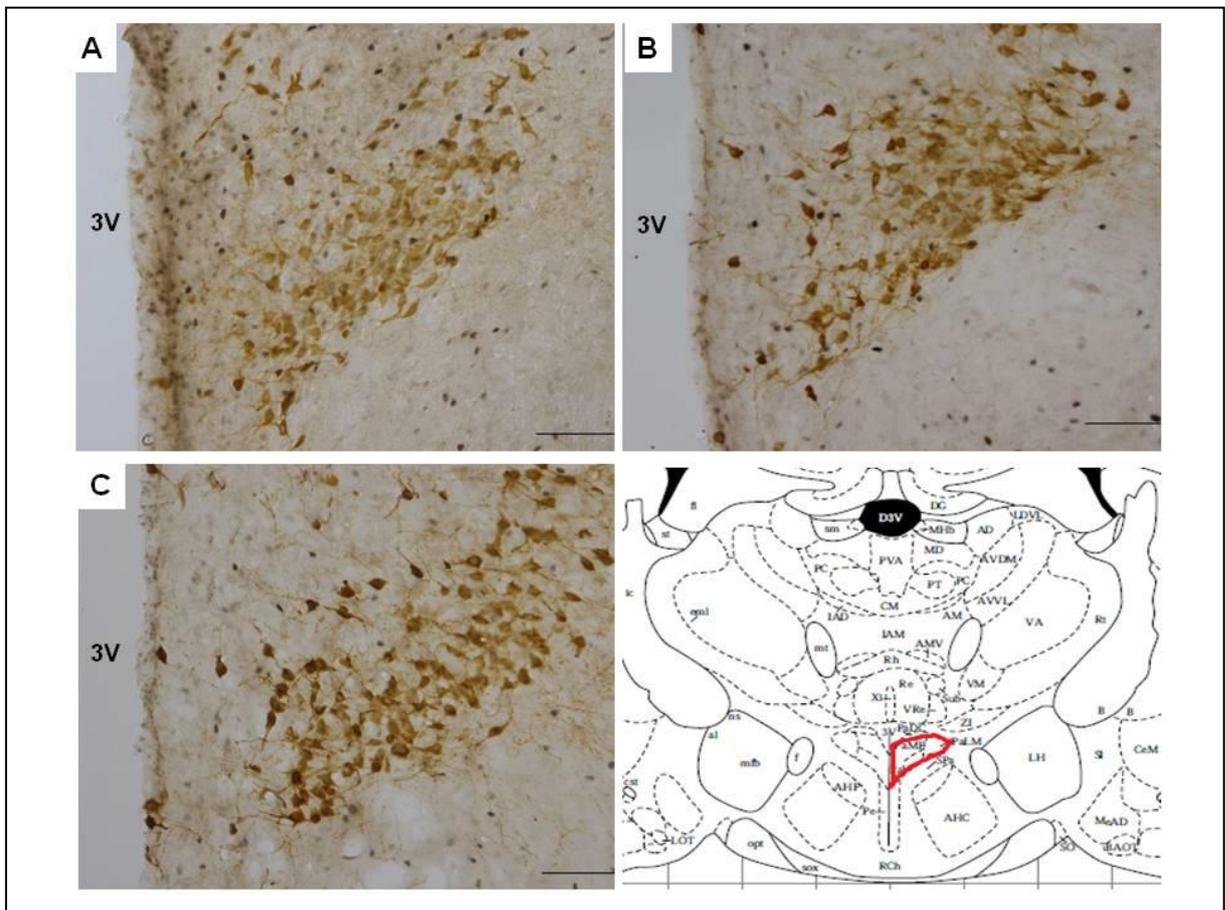
Figura 14 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos em neurônios ocitocinérgicos do SON após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.



Fonte: Da autora

Nota: SON núcleo supra-óptico. Fotomicrografias no aumento de 20x. Escala de 100 μ m. QO: quiasma óptico.

Figura 15 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos em neurônios ocitocinérgicos do PVN após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.



Fonte: Da autora

Nota: PVN (MM) região magnocelular do núcleo paraventricular. Fotomicrografias no aumento de 20x. Escala de 100 μ m. 3V: terceiro ventrículo.

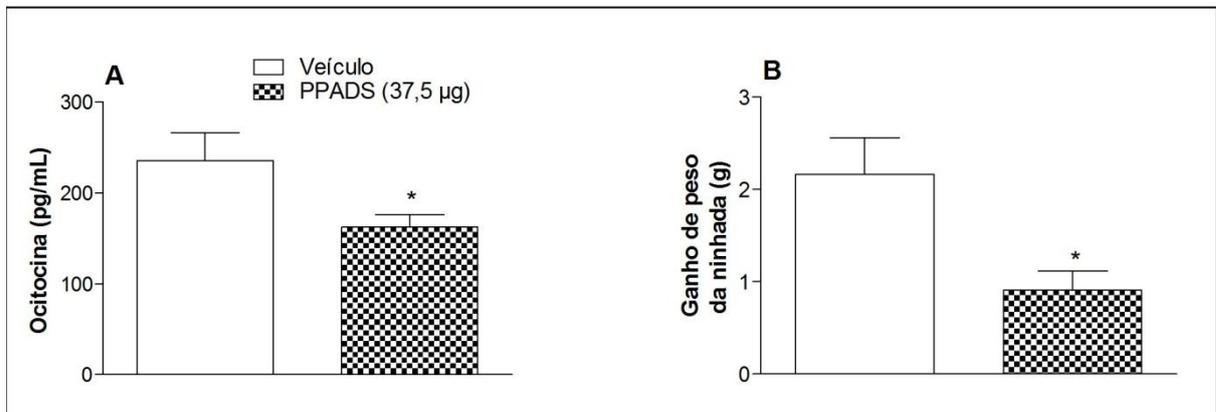
6.3 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE OCITOCINA EM RATAS LACTANTES E NO GANHO DE PESO DA NINHADA

A administração central de PPADS (dose de 37,5 μ g) em ratas lactantes resultou em uma redução da concentração plasmática de OT após 15 minutos de permanência em CMT quando comparado com ratas que receberam a solução veículo ($p < 0,05$; Figura 16A).

Além disso, a infusão intracerebroventricular de PPADS (dose de 37,5 μ g) em ratas lactantes resultou em um menor ganho de peso da ninhada após

permanecerem 15 minutos em CMT quando comparado com ratas que foram tratadas com salina ($p < 0,05$; Figura 16B).

Figura 16 - Efeito da microinjeção de PPADS na concentração plasmática de ocitocina e no ganho de peso na ninhada.



Fonte: Da autora

Nota: Concentração plasmática de ocitocina (A) e o ganho de peso da ninhada (B) após a microinjeção da solução veículo ou PPADS na dose de 37,5 µg em ratas lactantes. Valores expressos como média \pm EPM ($n=8$ animais por grupo). * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

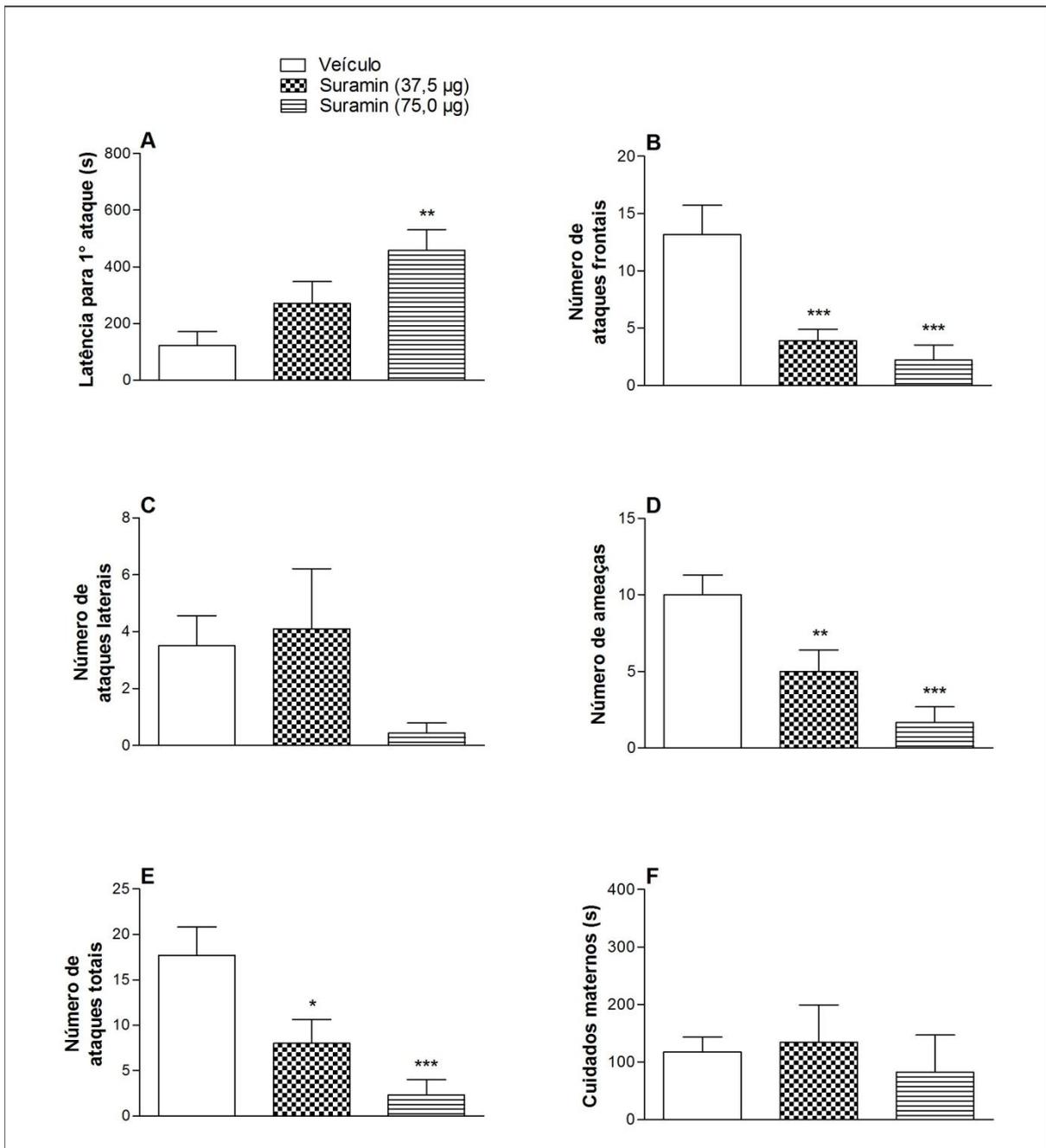
6.4 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NO COMPORTAMENTO AGRESSIVO

A análise do comportamento de agressividade materna demonstrou que administração central de Suramin na dose de 75,0 µg em ratas lactantes aumentou a latência para o primeiro ataque ($F_{2,28} = 6,11$; $p < 0,01$; Figura 17A) em relação ao grupo controle. Além disso, a administração central de Suramin nas doses de 37,5 µg e 75,0 µg reduziu o número de ataques frontais ($F_{2,28} = 11,28$; $p < 0,001$ e $p < 0,001$ respectivamente; Figura 17B); reduziu o número de ameaças laterais ($F_{2,28} = 10,93$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente; Figura 17D) e reduziu o número de ataques totais ($F_{2,28} = 8,87$; $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente; Figura 17E) quando comparado com o grupo controle. Enquanto a infusão de Suramin não interferiu no número de ataques laterais ($F_{2,28} = 1,82$; $p > 0,05$; Figura 17C) e no tempo em que a rata executa cuidados maternos ($F_{2,28} = 0,23$; $p > 0,05$; Figura 17F).

Com relação ao antagonista específico de receptores P2X, a administração central de PPADS nas doses de 37,5 µg e 75,0 µg em ratas lactantes aumentou a

latência para o primeiro ataque ($F_{2,29}= 6,95$; $p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente; Figura 18A); reduziu o número de ataques frontais ($F_{2,29}= 14,83$; $p<0,001$ e $p<0,001$, respectivamente; Figura 18B); reduziu o número de ataques laterais ($F_{2,28}= 7,52$; $p<0,01$ e $p<0,01$, respectivamente; Figura 18C); reduziu o número de ameaças laterais ($F_{2,29}= 9,15$; $p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente; Figura 18D) e reduziu o número de ataques totais ($F_{2,29}= 18,53$; $p<0,001$ e $p<0,001$, respectivamente; Figura 18E) quando comparado com o grupo controle. Enquanto a infusão de PPADS não interferiu no tempo em que a rata executa cuidados maternos ($F_{2,29}= 2,65$; $p>0,05$; Figura 18F).

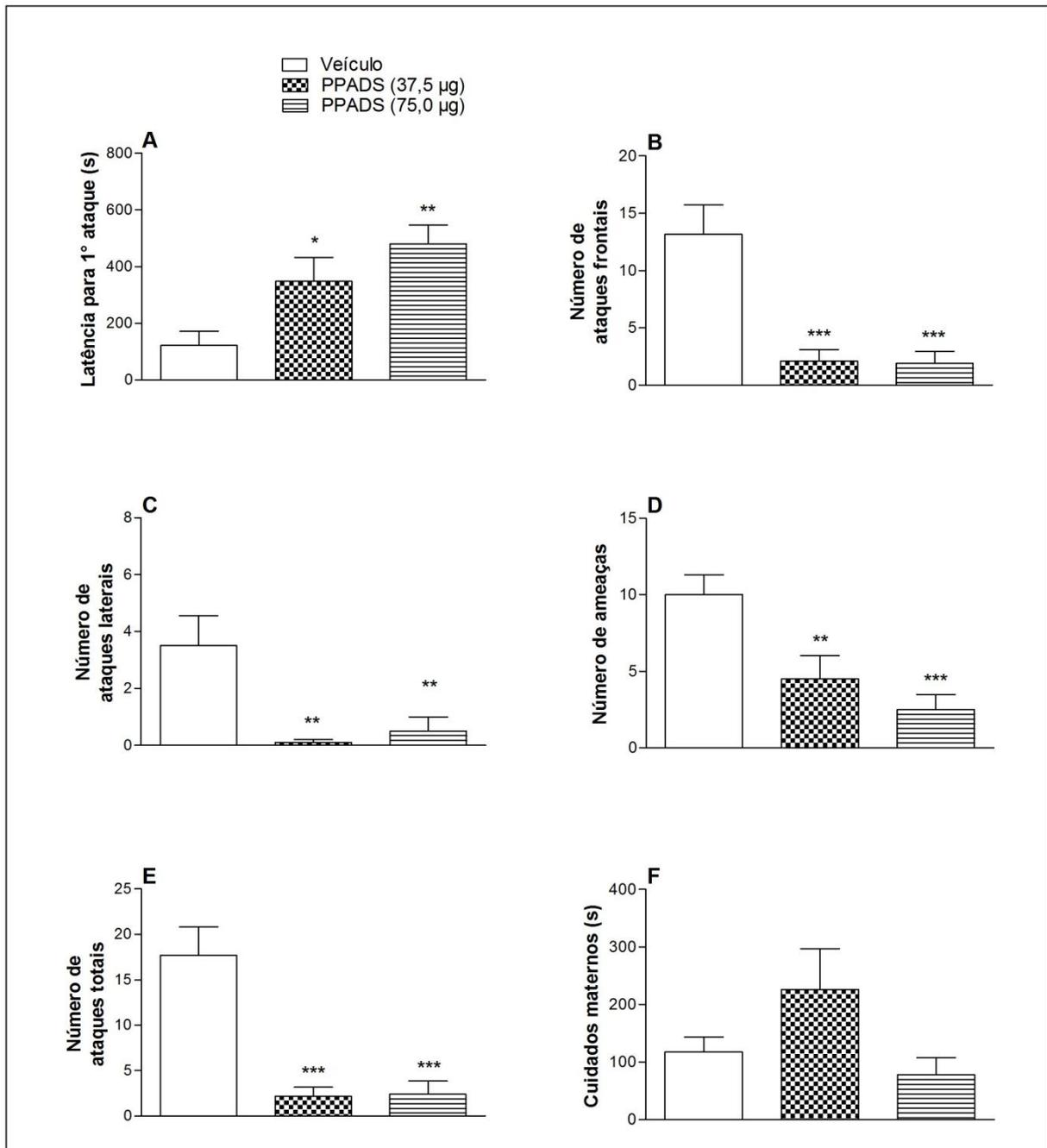
Figura 17 - Efeito da microinjeção de Suramin no comportamento agressivo.



Fonte: Da autora

Nota: Latência em segundos para o primeiro ataque (A), número de ataques frontais (B), número de ataques laterais (C), número de ameaças laterais (D), número de ataques totais (E) e tempo de cuidados maternos (F) após a microinjeção da solução veículo ou Suramin nas doses de 37,5 µg e 75,0 µg (i.c.v) em ratas lactantes. Valores expressos como média ± EPM (n=9-10 animais por grupo). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 quando comparado com o grupo controle.

Figura 18 - Efeito da microinjeção de PPADS no comportamento agressivo.



Fonte: Da autora

Nota: Latência em segundos para o primeiro ataque (A), número de ataques frontais (B), número de ataques laterais (C), número de ameaças laterais (D), número de ataques totais (E) e tempo de cuidados maternos (F) após a microinjeção da solução veículo ou PPADS nas doses de 37,5 µg e 75,0 µg (i.c.v) em ratas lactantes. Valores expressos como média ± EPM (n=10 animais por grupo). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 quando comparado com o grupo controle.

6.5 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NA ATIVAÇÃO NEURONAL EM REGIÕES ENVOLVIDAS COM O COMPORTAMENTO AGRESSIVO

Na tabela 2 pode-se observar que a microinjeção de Suramin ou PPADS (dose de 75,0 µg) reduziu o número de células positivas para c-Fos no VMH ($F_{2,17}= 16,20$; $p<0,001$ e $p<0,001$ respectivamente; Figura 19), na AHA ($F_{2,17}= 8,55$; $p<0,01$ e $p<0,01$ respectivamente; Figura 20), na HAA ($F_{2,17}= 6,18$; $p<0,05$ e $p<0,05$ respectivamente; Figura 21), na PAGvl ($F_{2,18}= 3,98$; $p<0,05$ e $p<0,05$ respectivamente; Figura 22) e na MeA ($F_{2,18}= 4,47$; $p<0,05$ e $p<0,05$ respectivamente; Figura 23) em relação ao grupo controle. Nenhuma alteração significativa foi encontrada no número de células positivas para c-fos na MPOA ($F_{2,18}= 1,52$; $p=0,24$), no PVN ($F_{2,17}= 0,37$; $p=0,69$), no FPCvo ($F_{2,18}= 0,38$; $p=0,68$), no LSv ($F_{2,18}= 1,38$; $p=0,27$) e na CeA ($F_{2,18}= 1,19$; $p=0,32$) quando realizada a comparação entre os grupos.

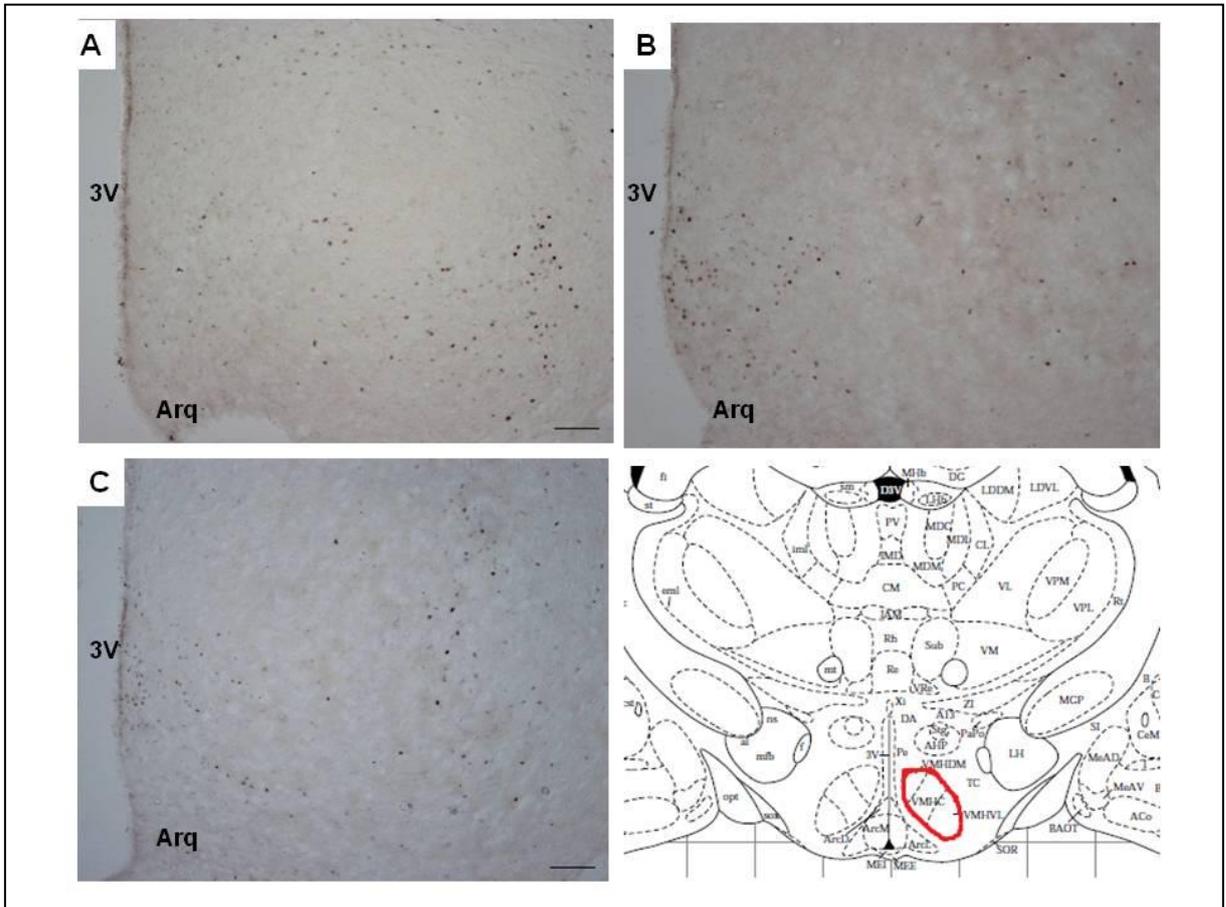
Tabela 2 - Efeito da microinjeção de Suramin ou PPADS sobre o número de células positivas para c-Fos no VMH, AHA, HAA, MPOA, PVN, FPCvo, SLv, PAGvl, CeA e MeA.

	Veículo	Suramin	PPADS
c-Fos			
VMH	67,33 ± 10,63	17,33 ± 2,45***	29,00 ± 2,76***
AHA	80,17 ± 13,91	32,17 ± 6,09**	35,17 ± 4,78**
HAA	70,17 ± 10,84	28,33 ± 6,20*	36,33 ± 6,20*
MPOA	80,33 ± 14,20	49,67 ± 14,15	55,43 ± 10,73
PVN	27,67 ± 8,27	25,83 ± 11,14	18,17 ± 3,50
FPCvo	49,33 ± 14,63	36,50 ± 9,54	44,86 ± 5,87
LSv	26,83 ± 8,66	13,83 ± 3,27	25,00 ± 4,66
PAGvl	23,50 ± 6,88	10,67 ± 2,57*	8,42 ± 0,94*
CeA	24,83 ± 7,25	15,67 ± 4,08	15,43 ± 2,62
MeA	79,67 ± 23,07	26,67 ± 4,58*	38,14 ± 2,51*

Fonte: Da autora

Nota: VMH núcleo ventromedial do hipotálamo, AHA área hipotalâmica anterior, HAA área hipotalâmica do ataque, MPOA área pré-óptica medial, PVN núcleo paraventricular, FPCvo córtex pré-frontal ventro-orbital, LSv septo lateral ventral, PAGvl Substância periaqueductal ventro-lateral, CeA amígdala central e MeA amígdala medial. Valores expressos em média ± EPM (n=6-7 animais por grupo). * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ quando comparado com o grupo controle.

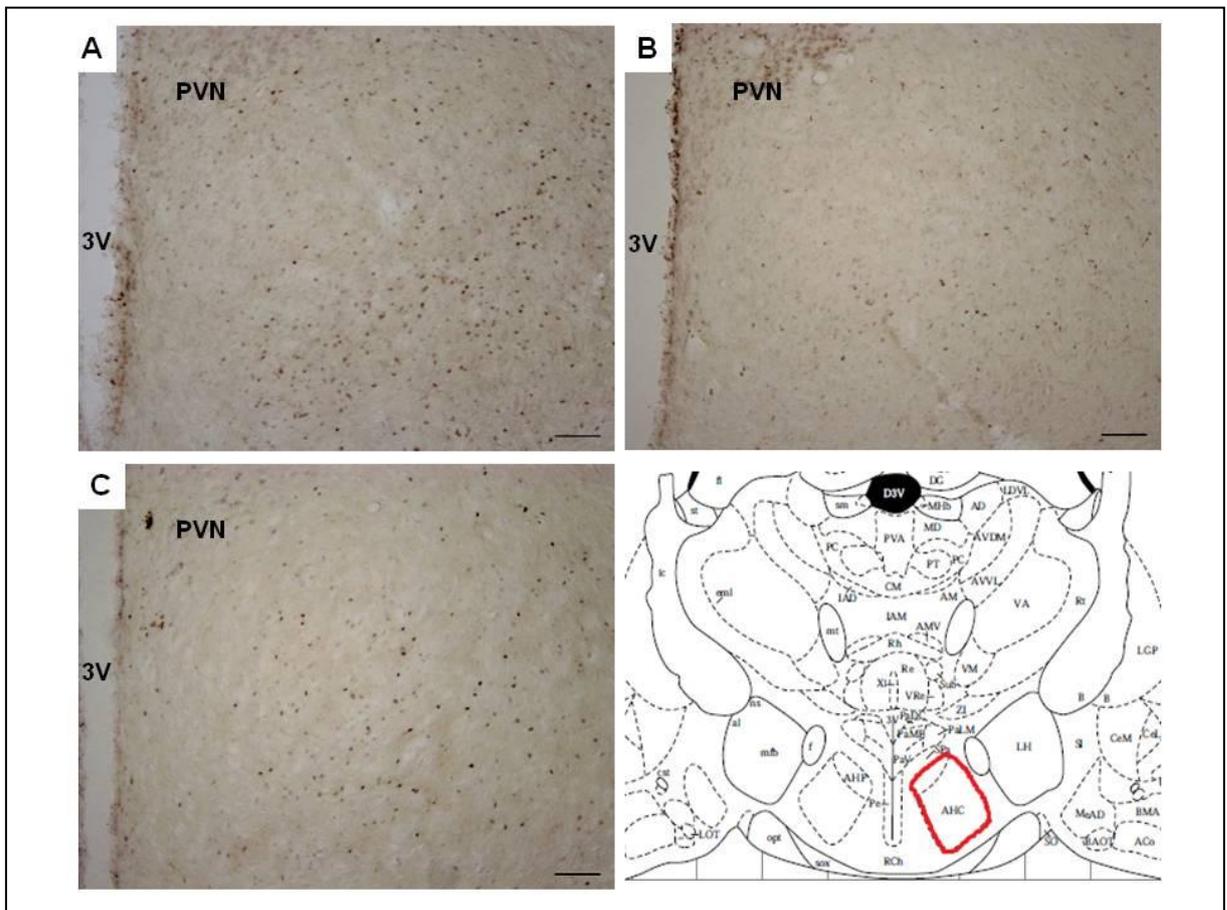
Figura 19 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos no VMH após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.



Fonte: Da autora

Nota: VMH núcleo ventromedial do hipotálamo. Fotomicrografias no aumento de 10x. Escala de 100 μ m. Arq: núcleo arqueado; 3V: terceiro ventrículo.

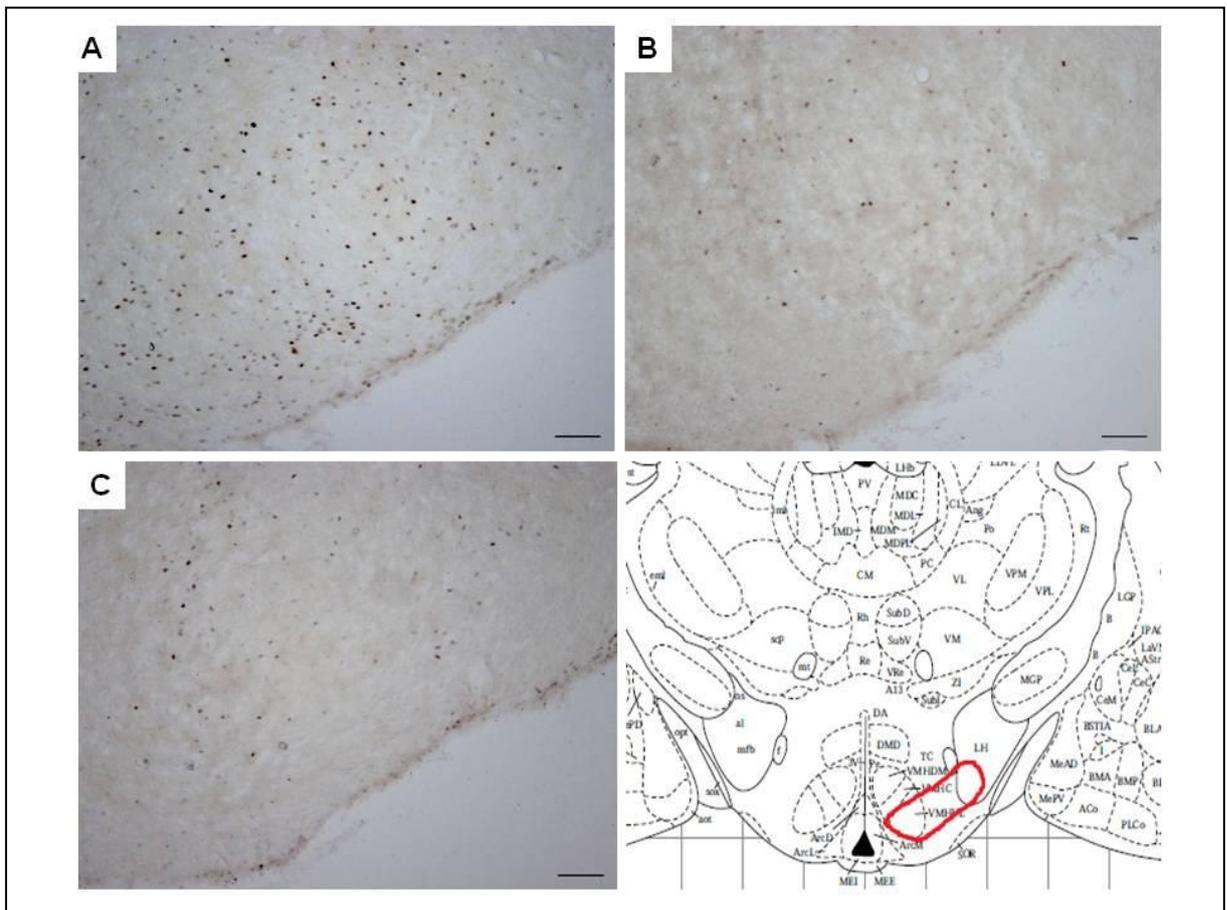
Figura 20 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos no AHA após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.



Fonte: Da autora

Nota: AHA área hipotalâmica anterior. Fotomicrografias no aumento de 10x. Escala de 100 μ m. PVN: núcleo paraventricular; 3V: terceiro ventrículo.

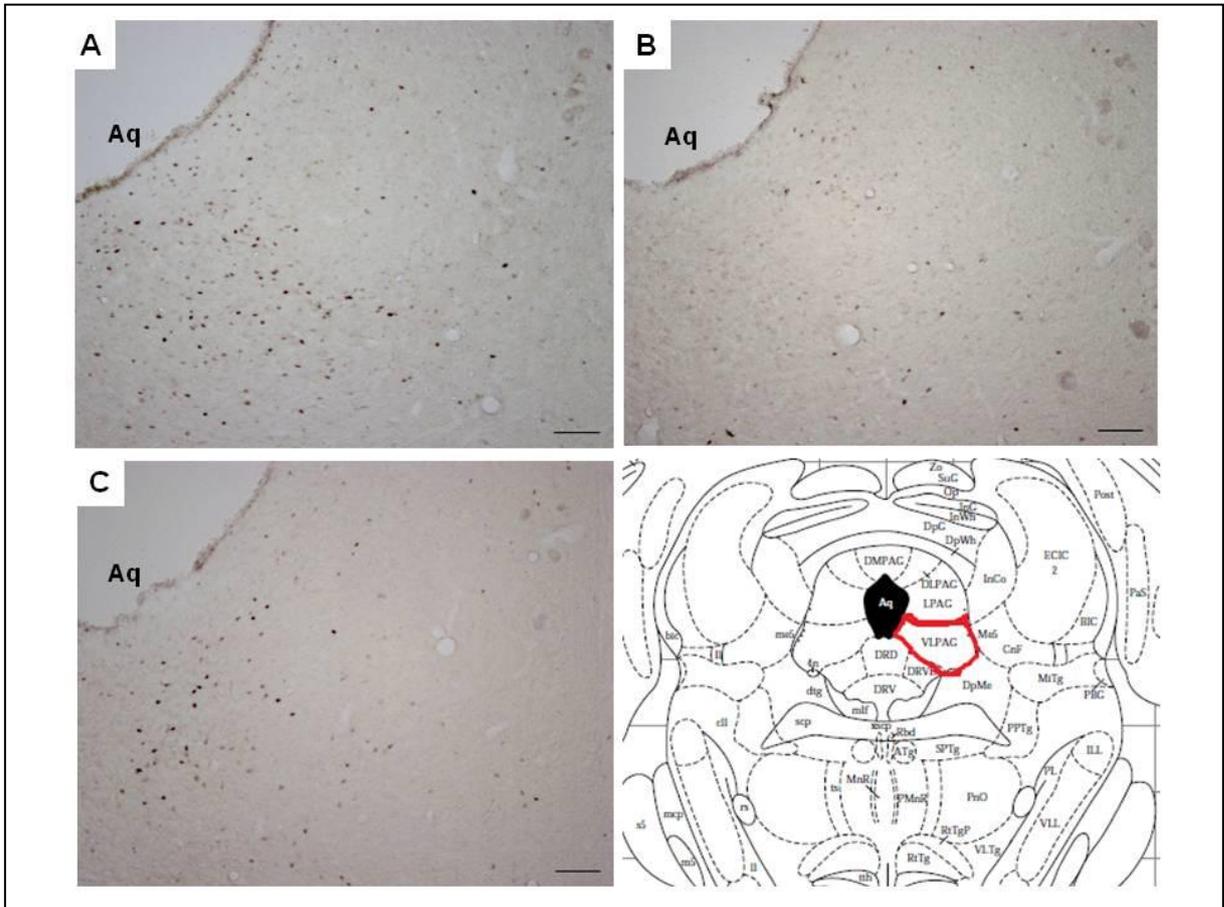
Figura 21 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos na HAA após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.



Fonte: Da autora

Nota: HAA área hipotalâmica do ataque. Fotomicrografias no aumento de 10x. Escala de 100 μ m.

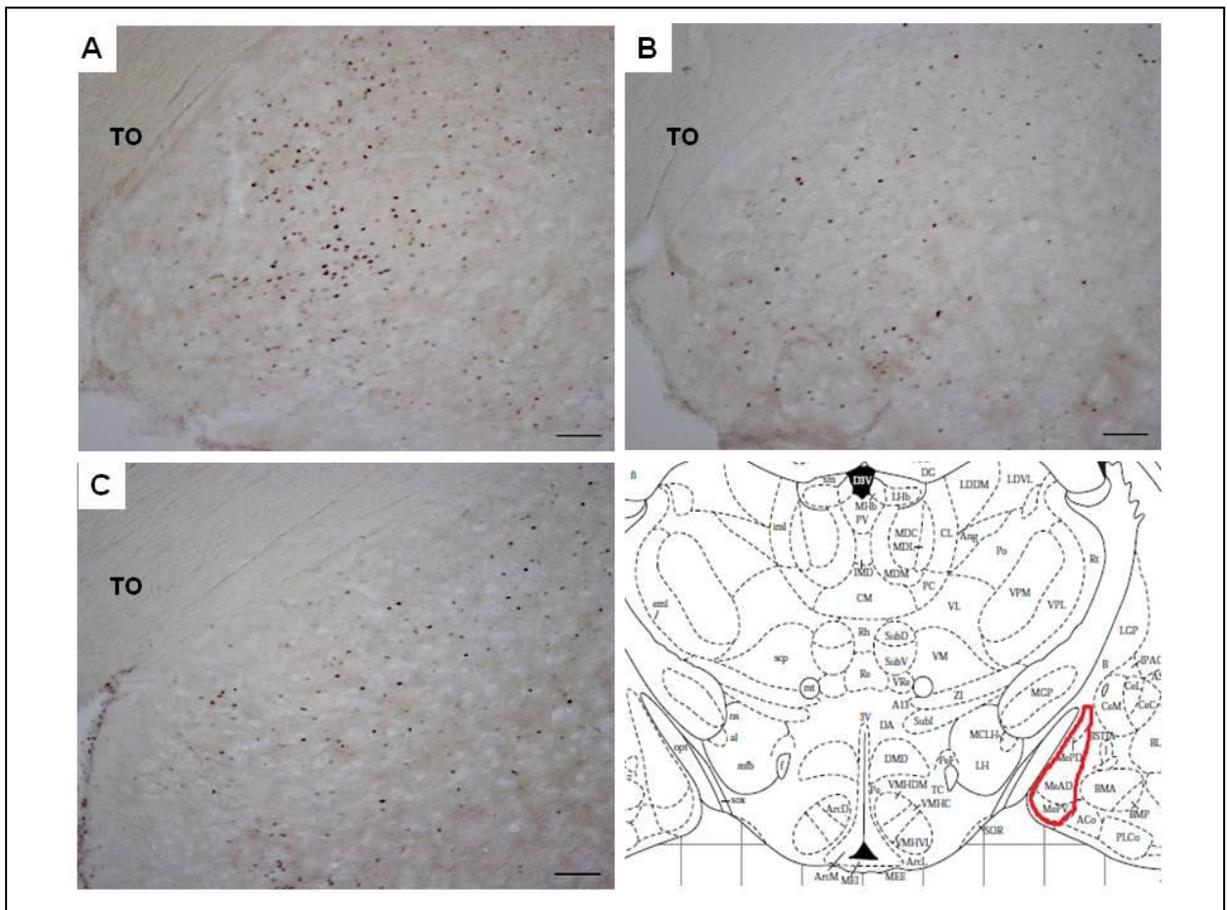
Figura 22 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos na PAGvl após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.



Fonte: Da autora

Nota: PAGvl Substância periaqueductal ventro-lateral. Fotomicrografias no aumento de 10x. Escala de 100 μ m. Aq: aqueduto cerebral.

Figura 23 - Fotomicrografia representativa de cortes cerebrais mostrando células positivas para c-Fos na MeA após a microinjeção da solução veículo (A) ou Suramin (B) ou PPADS (C) em ratas lactantes.



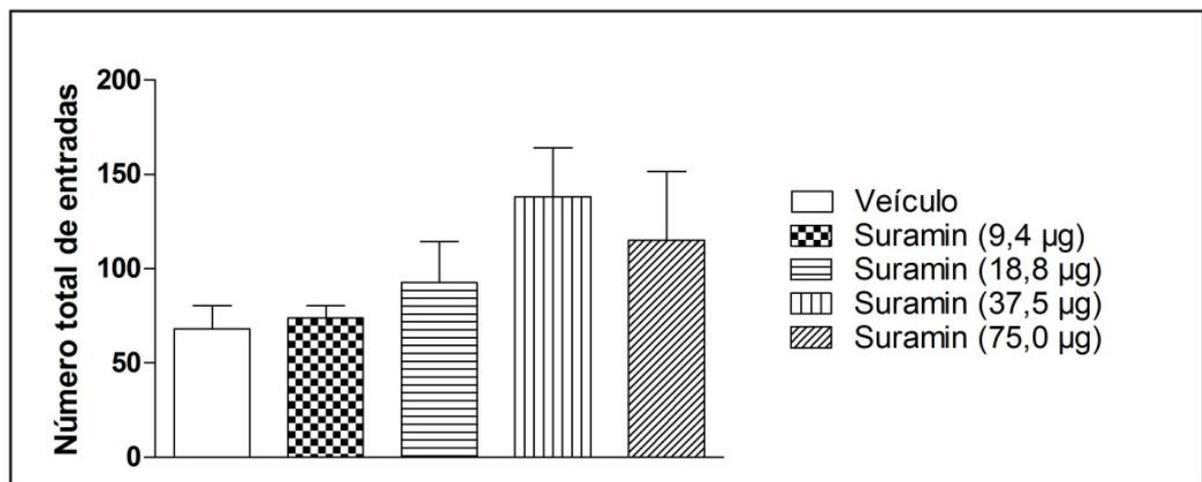
Fonte: Da autora

Nota: MeA Amígdala medial. Fotomicrografias no aumento de 10x. Escala de 100 µm. TO: trato óptico.

6.6 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NA ATIVIDADE LOCOMOTORA

A análise do campo aberto não evidenciou nenhuma alteração significativa no número total de entradas em ratas lactantes que receberam a microinjeção de Suramin em relação ao grupo controle ($F_{4,42} = 1,58$; $p = 0,19$; Figura 24), em ratas que receberam a microinjeção de PPADS em relação ao grupo controle ($F_{4,44} = 1,15$; $p = 0,34$; Figura 25) e também em ratas que receberam infusão central de α, β -MeATP em relação aos animais que receberam a solução veículo ($F_{3,25} = 2,72$; $p = 0,06$; Figura 26).

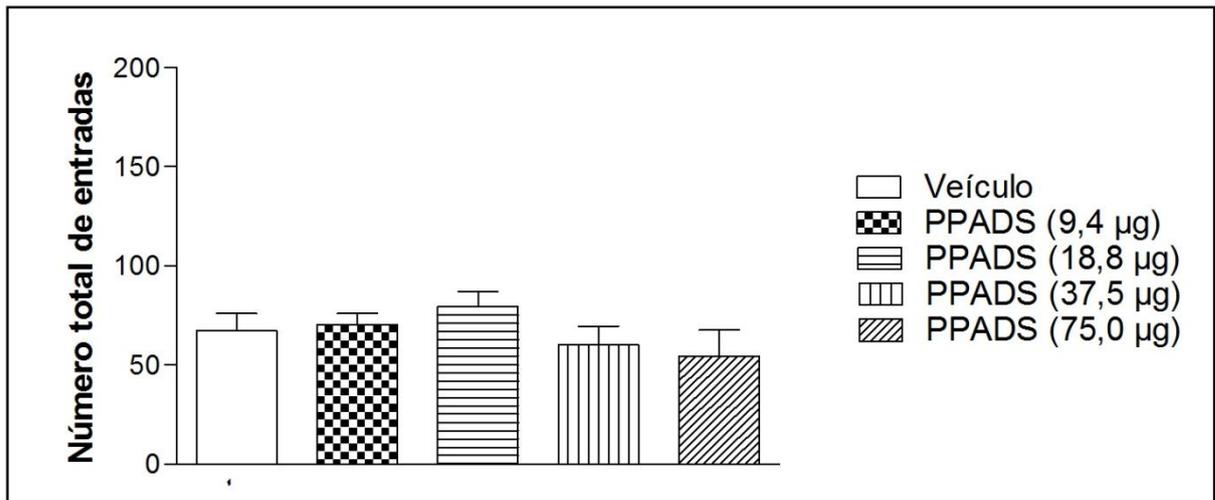
Figura 24 - Efeito da microinjeção de Suramin na atividade locomotora.



Fonte: Da autora

Nota: Número total de entradas no campo aberto após a microinjeção da solução veículo ou Suramin nas doses de 9,4 µg, 18,8 µg, 37,5 µg e 75,0 µg (i.c.v) em ratas lactantes (n=8-9 animais por grupo).

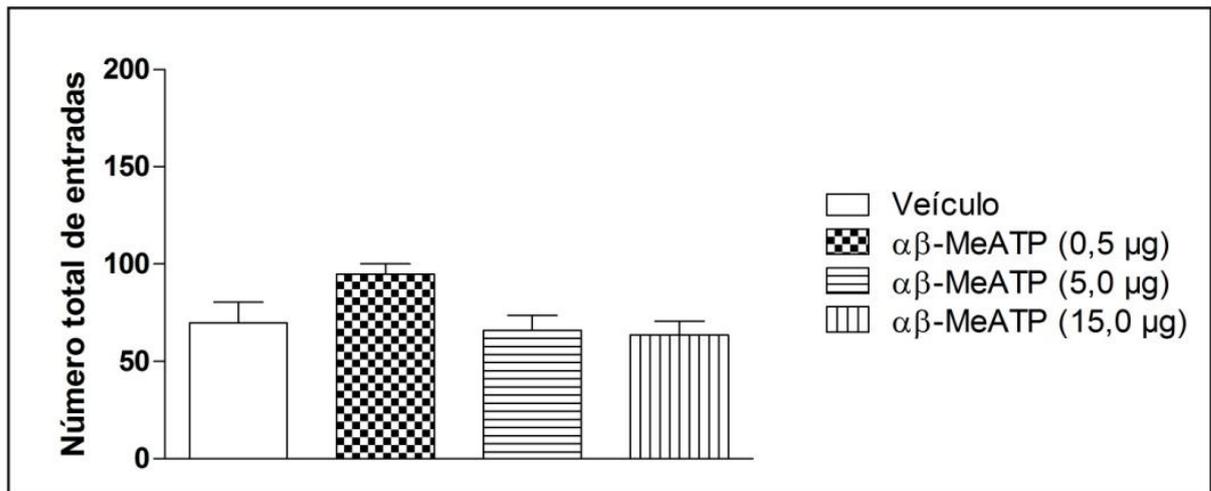
Figura 25 - Efeito da microinjeção de PPADS na atividade locomotora.



Fonte: Da autora

Nota: Número total de entradas no campo aberto após a microinjeção da solução veículo ou PPADS nas doses de 9,4 µg, 18,8 µg, 37,5 µg e 75,0 µg (i.c.v) em ratas lactantes (n=7-11 animais por grupo).

Figura 26 - Efeito da microinjeção de α,β -MeATP na atividade locomotora.



Fonte: Da autora

Nota: Número total de entradas no campo aberto após a microinjeção da solução veículo ou α,β -MeATP nas doses de 0,5 µg, 5,0 µg e 15,0 µg (i.c.v) em ratas lactantes (n=5-8 animais por grupo).

7 DISCUSSÃO

A administração central de antagonistas de receptores purinérgicos P2 reduziu os cuidados maternos, o comportamento agressivo de ratas lactantes e a ativação de neurônios localizados em áreas cerebrais envolvidas em tais comportamentos. Além disso, a administração de PPADS reduziu o ganho de peso da ninhada e a concentração plasmática de OT no período inicial da lactação. Entretanto, nenhuma alteração foi encontrada na atividade locomotora de ratas lactantes com a administração central destes antagonistas.

O CM em mamíferos engloba um conjunto de atividades voltadas direta ou indiretamente à prole. Em roedores de laboratório, há vários parâmetros que são estudados, incluindo a recuperação dos filhotes, que é indicativo de motivação maternal e a lambida (*liking pups*) que é uma importante medida de qualidade do CM uma vez que não somente promove a limpeza, estimula a micção e a defecação, mas também repercute no desenvolvimento social e emocional dos filhotes (CALDJI et al., 1998; CHAMPAGNE et al., 2003). Além disso, para fornecer a nutrição dos filhotes, as mães assumem diferentes posicionamentos sobre os mesmos, incluindo postura não arqueada e postura arqueada, sendo a última uma posição de *nursing* ativo no qual a mãe é totalmente engajada em uma postura da cifose quiescente (CALDJL et al., 1998; PEDERSEN; BOCCIA, 2003; OLAZÁBAL et al., 2013).

No presente estudo, a administração de antagonistas de receptores purinérgicos P2 (Suramin e PPADS) foi capaz de reduzir estes cuidados maternos. Embora existam evidências do papel de purinas e pirimidinas em diversos comportamentos (KRUEGER et al., 2010; BURNSTOCK et al., 2011; BURSNTOCK, 2016; TSUDA, 2017), até o momento, não foi evidenciado a participação dos receptores purinérgicos P2 no comportamento maternal em roedores. Assim, este é o primeiro estudo que demonstrou a atuação de nucleotídeos endógenos nos cuidados maternos através da infusão central de antagonistas de purinoceptores do tipo P2X e P2Y em ratas lactantes.

Além da redução dos parâmetros maternos, a administração central de Suramin ou PPADS reduziu a ativação de neurônios localizados na MPOA do

hipotálamo e no BNST. Estas áreas são essenciais na regulação do CM em ratos uma vez que a aplicação direta de estrógeno ou prolactina na MPOA/BNST facilita o CM (BRIDGES et al., 1990; NUMAN; ROSENBLATT; KOMISARUK, 1977; STACK et al., 2002), enquanto destruição excitotóxica ou elétrica assim como cortes das conexões neurais laterais desta região prejudica tal comportamento (JACOBSON et al., 1980; NUMAN, 1974; NUMAN et al., 1988; NUMAN et al., 1977; KALINICHEV; ROSENBLAT; MORRELL, 2000; STACK et al., 2002; NUMAN, 2007). Uma grande importância é dada a esta região uma vez que foi demonstrado que neurônios localizados na MPOA/BNST enviam projeções para outras regiões envolvidas na circuitaria neural que regula o CM, podendo assim controlar a atividade destas regiões (NUMAN; NUMAN, 1997; STACK et al., 2002; NUMAN, 2007).

Estudos recentes, utilizando imunistoquímica para determinar o padrão de ativação neuronal durante o CM de roedores, encontraram um grande aumento na expressão da proteína c-Fos na MPOA/BNST após 1-2 horas de exposição dos filhotes (CALAMANDREI; KEVERVE, 1994; FLEMING et al., 1994; NUMAN; NUMAN, 1994; NUMAN; NUMAN, 1996; NUMAN; NUMAN, 1997; NUMAN et al., 1998; LONSTEIN et al., 1998; STACK et al., 2002; VILELA et al., 2013). Além disso, Lonstein e colaboradores (1998) observaram que apenas o estímulo filhotes (na presença ou na ausência de sucção) é capaz de induzir elevações significativas de neurônios imunorreativos a c-Fos na MPOA e em áreas cerebrais interconectadas com a mesma.

Lee e colaboradores (2000) assim como Numan (2007) tem demonstrado que a MPOA está envolvida no aspecto motivacional do CM em ratas. Neste sentido, neurônios localizados nesta região interagem com o sistema dopaminérgico mesolímbico regulando somente comportamento maternal voluntário e, lesões na MPOA tende a romper estes componentes motores ativos do CM enquanto o comportamento de *nursing* permanece relativamente inafetado (NUMAN; WOODSIDE, 2010; NUMAN; INSEL, 2003; LONSTEIN et al., 1998). Por outro lado, de acordo com Numan (2007), está bem definida a atuação da MPOA na modulação de componentes motores ativos, porém, há controversas sobre sua participação na modulação do comportamento de *nursing* em roedores lactantes.

Entretanto, no presente estudo, ambos os grupos (Suramin e PPADS) apresentaram redução da ativação de neurônios localizados nestas regiões prosencefálicas, redução de componentes motores ativos (como lambida e recuperação dos filhotes) e prejuízo nos parâmetros de cifose e CMT em relação ao grupo controle. Assim, é possível que estes antagonistas também possam atuar em outras regiões da circuitaria maternal envolvida nos comportamentos reflexos para reduzir os parâmetros cifose e o CMT.

Além disso, a microinjeção de Suramin e PPADS também promoveu a redução da ativação de neurônios ocitocinérgicos do PVN e SON do hipotálamo, locais onde o neuropeptídeo OT é sintetizado e liberado pelos terminais nervosos na hipófise posterior e em várias regiões cerebrais. A sucção estimula a liberação de OT dentro da circulação sanguínea e no sistema nervoso central (SNC) de ratas lactantes (NEUMANN et al., 1993). Sistemicamente, este hormônio neurohipofisário é responsável por aumentar a contratilidade da musculatura lisa das glândulas mamárias promovendo a ejeção do leite durante o *nursing* (FEBO; FERRIS, 2014; CROWLEY, 2015). No SNC, sua liberação durante o parto é responsável por promover o início do CM, uma vez que a destruição do PVN (INSEL; HARBAUGH, 1989) assim como a administração de antagonista de OT em ratas lactantes promove um atraso no início (VAN LEENGOED; KERKER; SWANSON, 1987; FEBO; NUMAN; FERRIS, 2005) bem como prejuízo na manutenção do CM em roedores (CHAMPAGNE et al., 2001; PERDERSEN; BOCCIA, 2003; SHAHROKN et al., 2010).

Febo e colaboradores (2005) demonstraram, através de imagem de ressonância magnética, que regiões como BNST, MPOA e PVN são ativadas em resposta a sucção assim como com a administração central de OT. Além do aumento da liberação intracerebral de OT durante este período, foi encontrado elevada expressão de receptores de OT no BNST, MPOA e PVN (BOSCH; NEUMANN, 2012; FEBO; FERRIS, 2014), e tal elevação tem sido correlacionada com altos níveis de lambida sobre os filhotes (CHAMPAGNE et al., 2001).

Neste contexto, o presente estudo também encontrou uma redução da concentração plasmática de OT e um menor ganho de peso dos filhotes após a microinjeção do antagonista PPADS na dose de 37,5 µg. Sabendo-se que o estímulo

de sucção promove a liberação pulsátil de OT dos terminais neurohipofisários nos capilares fenestrados, que por sua vez, atinge a circulação sanguínea e assim o tecido mamário para promover a ejeção do leite (HATTON; WANG, 2008; CROWLEY, 2015), a diminuição da secreção de OT durante a lactação em ratas tratadas com PPADS pode resultar em menor transferência de leite para os filhotes, representando em um menor ganho de peso da ninhada. Entretanto, não foi possível realizar a dosagem hormonal em ratas tratadas com Suramin uma vez que as mesmas não apresentam cuidados maternos que permitem o estímulo de sucção dos filhotes, que é indispensável para a realização do teste.

Como o estudo atual encontrou mesmo na presença do estímulo da sucção, uma redução da concentração plasmática de OT e uma menor transferência de leite para os filhotes, é provável que estes achados sejam uma consequência da inibição direta e/ou indireta do PPADS na ativação dos neurônios ocitocinérgicos. Como a droga é administrada por via intracerebroventricular, a mesma pode bloquear receptores purinérgicos localizados na MPOA/BNST na qual já foi evidenciado expressão de RNAm e de receptores purinérgicos P2 (COLLO et al., 1996; XIANG; HE; BURNSTOCK, 2006; SONG et al., 2011; FLORENZANO et al., 2008), reduzindo a ativação neuronal nesta área, que por sua vez, envia projeções para o PVN, reduzindo a ativação de neurônios ocitocinérgicos e consequentemente, resultando em uma menor liberação de OT.

Corroborando esta hipótese, diversos trabalhos propõem que é possível que projeções da MPOA para o PVN promova a liberação de OT na hipófise como parte de um reflexo de ejeção do leite (SIMERLY; SWANSON, 1988; NUMAN; NUMAN, 1996; FEBO et al., 2005). Além disso, a MPOA pode regular a liberação de OT em diversas áreas cerebrais, inclusive na própria MPOA, podendo este hormônio exercer uma influência neuromodulatória nos neurônios desta região e regular o comportamento maternal (NUMAN; WOODSIDE 2010; DOBOLYI; GRATTAN; STOLZENBERG, 2014). Neste sentido, Pedersen e colaboradores (1994) encontraram redução dos cuidados maternos após a infusão de antagonista de OT diretamente na MPOA de ratas.

Por outro lado, também é possível que o antagonista bloqueie os receptores purinérgicos P2 diretamente nos núcleos de origem de OT (PVN e SON) e com isso

reduzir a concentração plasmática de OT em ratas lactantes e, conseqüentemente, diminuindo os cuidados maternos uma vez que este neuropeptídeo participa tanto do início como da manutenção deste comportamento específico. Além do mais, estudos do nosso laboratório também têm enfatizado a importância da via ocitocinérgica no comportamento de ratas lactantes ao encontrar redução dos parâmetros maternos associados à redução dos valores plasmáticos de OT e da ativação de neurônios do SON e de neurônios magnocelulares do PVN com a administração central e periférica de outras substâncias (VILELA; GIUSTI-PAIVA; 2011; VILELA et al., 2013; PEREIRA; GIUSTI-PAIVA; VILELA, 2015).

Neste contexto, há uma série de estudos que sugerem uma possível interação entre os sistemas purinérgico e ocitocinérgico no hipotálamo. Técnicas de *hibridização in situ*, análises de PCR e imunistoquímica tem mostrado que neurônios neurosecretórios localizados nos núcleos SON e PVN expressam RNAm e proteínas receptoras para P2X e P2Y (COLLO et al., 1996; SHIBUYA et al., 1999; SONG; GOMES; STEVENS, 2009; VAVRA; BHATTACHARYA; ZEMKOVA, 2011; SONG et al., 2011). Além disso, através da técnica de imunistoquímica de dupla-marcação, foi avaliado a distribuição de receptores P2 e co-localização destes receptores com neurônios ocitocinérgicos nos núcleos hipotalâmicos SON e PVN de ratos. Foi encontrada a expressão dos receptores P2X2, P2X4, P2X5, P2X6 e P2Y4 em ambos os núcleos. Entretanto, a co-localização destes receptores com neurônios OT foi diferentemente encontrada nestes núcleos. No SON, neurônios que contém OT também expressaram os receptores P2X2, P2X4, P2X5 e P2Y4 enquanto no PVN, estes neurônios que contém OT expressaram apenas os receptores P2X4 e P2Y4 (GUO et a., 2009; SONG et al., 2011).

Além disso, há várias linhas de evidências que apoiam a existência de receptores funcionais P2 nestes núcleos hipotalâmicos. Receptores purinérgicos P2X são canais permeáveis a cátions como o cálcio (Ca^{+2}) (GEVER et al., 2006). O Ca^{+2} é um segundo mensageiro vital que controla muitas funções fisiológicas, tal como a liberação de neuropeptídeos e neurotransmissores (GUO et al., 2009). Este segundo mensageiro induzido pelo ATP via purinoceptores P2X está envolvido na liberação de neuropeptídeos no sistema hipotalâmico neuro-hipofisário, como a OT (CHEN; LEVY; LIGHTMAN, 1994; TROADEC et al., 1998; KNOTT; VELÁZQUEZ-MARRERO; LEMOS, 2005; GOMES et al., 2009). Deste modo, a ativação de canais

P2X causa despolarização da membrana celular que resulta na abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes e aumento de Ca^{+2} intracelular (SHIBUYA et al., 1999). Posteriormente, constatou-se que este aumento de Ca^{+2} intracelular foi ocasionado pela entrada de Ca^{+2} através de receptores P2X, mais do que via canal de cálcio voltagem-dependente (GUO et al., 2009). Estudos demonstraram que estas respostas de aumento dos níveis de Ca^{+2} intracelular e da liberação hormonal a nível hipotalâmico induzida pelo ATP foi atenuada ou abolida com a administração dos mesmos antagonistas utilizados no presente estudo (PPADS e Suramin) nos terminais neuro-hipofisários de ratos (GUO et al., 2009; KAPOOR; SLADEK, 2000; SHIBUYA et al., 1999; GOMES et al., 2009).

Entretanto, nucleotídeos de purinas e pirimidinas também podem modular uma variedade de funções fisiológicas pela interação com receptores P2Y (ABBRACCHIO; CERUTI, 2006; SONG et al., 2011). Song e colaboradores (2011) sugerem que purinoceptores do tipo P2Y estejam envolvidos na regulação da liberação dos neuropeptídeos hipotalâmicos, sendo que o subtipo P2Y1 foi encontrado ser predominantemente responsável pela liberação de cálcio dos estoques intracelulares, na ausência de cálcio extracelular, promovendo a liberação de neuropeptídeos nos terminais neurohipofisários de ratos e camundongos (SONG; GOMES; STEVENS, 2009). Assim, este aumento de cálcio pode ser induzido pela ativação de receptores P2Y que promove a liberação de cálcio mediado pelo trifosfato de inositol (IP3) dos estoques intracelulares (SHIBUYA et al., 1999). Deste modo, a ativação de ambas as classes de receptores purinérgicos P2 contribuem para aumento de cálcio intracelular induzido pelo ATP nos neurônios neurosecretórios do hipotálamo (SONG; VIJAYARAGHAVAN; SLADEK, 2007).

Além do envolvimento do ATP na secreção hormonal, já foi demonstrado sua participação em outras funções hipotalâmicas como na regulação da temperatura corporal, regulação do sono e vigília, controle da ingestão alimentar, controle do equilíbrio hidroeletrólítico e respostas autonômicas simpáticas cardiovasculares (MORI; TSUSHIMA; MATSUDA, 1992; GOURINE et al., 2002; SEILDEL et al., 2006; SERGEEVA et al., 2006; BUSNARDO et al., 2013).

Entretanto, no presente estudo, nenhuma alteração dos parâmetros maternos foi encontrado nos animais que receberam microinjeção de α,β -meATP em relação

ao grupo controle. Sugerimos que tal fato possa ser decorrente de uma resposta máxima alcançada durante o CM em ratas tratadas com solução veículo, não sendo possível uma elevação ainda maior de tal resposta com a administração do agonista exógeno.

Outra hipótese seria a não participação dos receptores P2X1 e P2X3 neste processo, uma vez que o agonista α,β -meATP possui elevada especificidade por estes subtipos de purinoceptores (GEVER et al., 2006; CODDOU et al., 2011). Neste sentido, Knott e colaboradores (2012) ao avaliar a resposta da corrente nos terminais e corpos celulares do sistema hipotalâmico-neurohipofisário ativada por diferentes agonistas em comparação ao ATP, encontrou uma menor resposta ao α,β -meATP nos terminais em relação aos demais. Corroborando com estes achados, a exposição ao α,β -meATP não aumentou a concentração intracelular de Ca^{+2} nos neurônios do sistema hipotálamo-neurohipofisário que haviam demonstrado uma resposta proeminente ao ATP (GOMES et al., 2009).

Além da alteração nos cuidados maternos, o presente estudo encontrou redução do comportamento agressivo concomitantemente com a redução da ativação neuronal em regiões envolvidas neste comportamento em animais que receberam infusão de Suramin ou PPADS, sugerindo que a sinalização purinérgica P2 também esteja envolvida na expressão deste específico comportamento maternal em roedores. No entanto, nenhuma informação foi encontrada na literatura a respeito da participação desta sinalização na agressividade em roedores, embora existam estudos demonstrando o envolvimento de receptores purinérgico P1 no comportamento agressivo de roedores machos e no comportamento de auto-agressão (GIMÉNEZ-LLORT et al., 2002; USHIJIMA; KATSURAGI; FURUKAWA, 1984; LEDENT et al., 1997).

Como o CM inclui um espectro de distintos comportamentos, variando de *nursing* à agressão, cada comportamento apresenta uma circuitaria específica envolvida (GAMMIE, 2005). Embora o circuito neural envolvido na agressão materna não estar bem definido e as informações a esse respeito encontrarem bastante esparsas na literatura, estudos com lesões e manipulações farmacológicas sugerem que algumas regiões neurais estejam envolvidas em tal comportamento como

MPOA, PVN, SL, AHA, HAA, VMH, núcleos do complexo amigdalóide, PAG e voFPC (MOTTA et al., 2013; DE ALMEIDA; FERREIRA; AGRATI, 2014).

A imunorreatividade à proteína c-Fos, um marcador indireto da atividade neuronal, tem sido grandemente útil para ajudar a esclarecer as mudanças cerebrais que ocorrem durante a lactação (HASEN; GAMMIE, 2005). O presente estudo encontrou redução da ativação de neurônios localizados no VHM, na vIPAG, na AHA, na HAA e no MeA associado à redução do número de ataques frontais, ataques laterais, ameaças laterais e ataques totais frente a um macho intruso após a infusão central de antagonistas de receptores P2. Assim, tais respostas comportamentais podem ser decorrentes do bloqueio de purinoceptores pelos antagonistas Suramin ou PPADS nestas regiões cerebrais envolvidas no comportamento agressivo, uma vez que já foi evidenciado a presença de RNAm para receptores assim como receptores P2X e P2Y em todas estas regiões (BEJLOBABA; JANJIC; STOJILKOVIC, 2015; BURNSTOCK, 2015; COLLO et al., 1996; SONG et al., 2011; STECULORUM et al., 2015; XIANG; HE; BURNSTOCK, 2006; DIAZ-HERNANDES et al., 2001; KITTNER et al., 2003; XIAO; LI; SUN, 2015; WORTHINGTON et al., 1999; FLORENZANO et al., 2008; GURIN et al., 2003; KITTNER et al., 2006).

. Deste modo, a integridade destas regiões hipotalâmicas (VHM, AHA, HAA) assim como a PAG e MeA são extremamente importantes para a expressão do comportamento agressivo em roedores. Neste sentido, de acordo com Roberts e Nagel (1996) assim como Lin e colaboradores (2011), o VMH e suas projeções foram considerados de extrema importância para a expressão do comportamento agressivo. Lesões eletrolíticas ou com ácido ibotênico deste núcleo e adjacências durante o período pós-parto diminuíram severamente o comportamento agressivo maternal tanto em ratos (HANSEN, 1989; HANSEN; FERREIRA, 1986) como em camundongos (GAMMIE, 2005).

Este controle comportamental do hipotálamo medial é provavelmente exercido através de suas intensas projeções para a PAG (SWANSON, 2000). A PAG tem sido reconhecida como uma via de saída para a execução de respostas reprodutivas assim como defensivas, incluindo respostas envolvendo riscos e comportamentos de fuga e de *freezing*, acompanhado por mudanças autonômicas

(FANSELOW, 1991, BEHBEHANI, 1995; CARRIVE et al., 1997; KEAY; BANDLER, 2001; CEZARIO et al., 2008). Em contrapartida ao presente estudo que encontrou redução dos parâmetros agressivos associados à redução da ativação neuronal na porção ventrolateral e caudal da PAG em animais tratados com antagonistas de purinoceptores P2, lesões pré e pós-parto desta região foram capazes de reduzir o tempo de latência das ratas para iniciarem o ataque e duplicar o número de ataques frente ao intruso, indicando que esta área inibe tonicamente a agressão maternal (LONSTEIN; STERN, 1997; FERREIRA et al., 2002; LONSTEIN; SIMMONS; STERN, 1998).

Por outro lado, também foi encontrado que a agressividade aumenta a atividade neuronal na PAGvl em roedores. Corroborando estes dados, Gammie e Nelson (2001) encontraram aumento de células positivas para pCREB nesta porção específica da PAG em camundongos fêmeas lactantes agressivas quando comparada com fêmeas não agressivas. Além disso, estudos recentes encontraram notável expressão de c-Fos na vlPAG de roedores machos expostos ao odor de gatos assim como ao seu predador natural (gato propriamente dito) (DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2004; STAPLES et al., 2005; COMOLI; RIBEIRO-BARBOSA; CANTERAS, 2003). Embora estes últimos não avaliaram o comportamento da rata lactante frente ao intruso co-específico, a atividade predatória também é um comportamento defensivo como o próprio comportamento maternal agressivo.

A expressão normal da agressão materna também depende essencialmente da atividade intacta do complexo amigdalóide, especialmente da amígdala medial (MeA), região que desempenha um importante papel no processamento da informação olfatória para detectar a presença do macho intruso, uma vez que recebe informação de ferormônios, via bulbo olfatório acessório, e projeta tal informação para os núcleos hipotalâmicos envolvidos no comportamento agressivo (GAMMIE, 2005; HALPERN; MARTINEZ-MARCOS, 2003; SCALIA; WINANS, 1975; MOTTA et al., 2013). Neste sentido, camundongos fêmeas lactantes e em ratas lactantes com alto nível de agressividade apresentaram aumento da expressão de Fos na MeA após a exposição ao macho intruso quando comparado a animais com baixo nível de agressão (GAMMIE; NELSON, 2001; HASEN; GAMMIE, 2005; POPESKI; WOODSIDE, 2004).

Já é bem conhecido que o hipotálamo apresenta uma outra região relacionada à agressividade, conhecido como “Área Hipotalâmica de Ataque” (HAA). A localização precisa desta região foi descrita por Kruk e colaboradores (1983, 1984) e Lammers e colaboradores (1988) como sendo uma extensa região hipotalâmica; entretanto, apenas dois terço caudal desta área, representada pela porção ventrolateral do VMH e pela região tuberal adjacente da área hipotalâmica lateral (LHAtu), tem sido considerada importante para a agressão maternal (MOTTA et al., 2013). Segundo Bathia e colaboradores (1995), o ataque afetivo, como a agressividade materna, é modulado por porções ventrais e laterais do hipotálamo, enquanto respostas dos ataques não afetivos são moduladas por regiões dorsomediais do hipotálamo, que não corresponde à HAA classicamente descrita.

Além disso, HAA corresponde à região que apresenta o menor limiar para deflagrar respostas de ataque. Corroborando com estes achados, Hasen e Gammie (2005) encontraram aumento da marcação da proteína c-Fos, principalmente na porção mais caudal desta região quando camundongos fêmeas lactantes foram exposta ao macho intruso em relação a camundongos fêmeas lactantes não exposta ao teste. Além disso, lesões eletrolíticas nesta região do hipotálamo mediobasal praticamente aboliram o ataque de ratas fêmeas lactantes frente ao macho intruso (HANSEN, 1989).

Outra região que recebe informação da MeA é o hipotálamo anterior (DELVILLE; DE VRIES; FERRIS, 2000). Embora não foram encontrados dados na literatura á respeito de sua participação na agressividade em fêmeas lactantes, estimulação elétrica nesta área hipotalâmica induziu a agressividade em ratos machos e em fêmeas (KRUK et al., 1983; KRUK et al., 1984, KRUK, 1991) .

Entretanto, o presente estudo não encontrou nenhuma alteração nos cuidados maternos quando a rata mãe foi exposta ao teste de agressividade. Esta reação pode ser resultado da escolha por defender a prole quando o animal é exposto a estímulos conflitantes (filhotes e intruso) que, por sua vez, são comportamentos incompatíveis de serem realizados concomitantemente (SUKIKARA et al., 2010). Isto pode ser resultado da ativação de áreas relacionadas apenas ao comportamento agressivo e/ou da inibição de áreas relacionadas aos cuidados diretos com a prole. Neste contexto, Gammie (2005) sugere que a ativação aguda

da MeA ou VHM em resposta ao intruso pode ativar a agressão maternal e inibir outros comportamentos. Por outro lado, Sukikara e colaboradores (2010) sugerem o papel da PAG na inibição do CM e ativação da resposta defensiva quando ratas Wistar foram expostas simultaneamente aos filhotes e ao odor de gatos. Este efeito deve ser transiente porque uma vez que o intruso deixa este ambiente, a rata imediatamente retorna as suas atividades maternas (GAMMIE, 2005).

No entanto, também tem sido evidenciada que alterações no sistema hormonal que ocorre neste período modulam este comportamento maternal indireto (FEBO; FERRIS, 2014; BRIDGES, 2015; BOSCH, 2013). Diversos estudos evidenciam a OT como sendo envolvida em tal comportamento. Neste sentido, tem sido correlacionada a quantidade de comportamento agressivo desempenhada pela mãe no teste de defesa maternal com o aumento da liberação deste neuropeptídeo dentro do PVN e da amígdala em ratas Wistar (BOSCH et al., 2005).

Além do impacto direto da OT no comportamento agressivo, a mesma pode promover este comportamento indiretamente por afetar a liberação de GABA e glutamato (BOSCH et al., 2007) ou por inibir os efeitos nos neurônios que contém o fator de liberação de corticotrofina (CRF). Tem sido demonstrado que a ativação do sistema CRF diminui o comportamento agressivo em ratas lactantes (KLAMPFL; NEUMANN; BOSCH, 2013). Além disso, o aumento da expressão de RNAm CRF no PVN seguida a exposição ao estresse é atenuada pela infusão central crônica de OT em ratas virgens ovariectomizadas (BOSCH, 2013). Apoiando esta hipótese, a OT cerebral inibe a atividade de neurônios CRF (WINDLE et al., 2004) e, especificamente, a liberação de OT dentro do PVN inibe a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (NEUMANN et al., 2000) podendo resultar no aumento da agressividade durante a lactação.

E contrapartida, lesões eletrolíticas do PVN reduziram vários componentes do comportamento agressivo (CONSIGLIO; LUCION, 1996) e aumentaram a liberação de OT dentro do PVN e amígdala durante o teste de defesa maternal em ratas Wistar (BOSCH et al., 2004; BOSCH et al., 2005). Assim como, lesões induzidas por ácido ibotênico da porção parvocelular do PVN assim como a inibição local da síntese de OT resultou em aumento da frequência de mordidas de ratas mães contra o intruso (GIOVENARDI et al., 1998). Deste modo, embora este neuropeptídeo

participe da regulação do início e da manutenção do CM (PEDERSEN; BOCCIA, 2002; NUMAN; INSEL, 2003), está menos esclarecido ou mesmo controverso seu envolvimento no comportamento agressivo em ratas lactantes (BOSCH et al., 2005).

Embora o presente estudo não avaliou a ativação de neurônios ocitocinérgicos após comportamento agressivo, nenhuma alteração foi encontrada na atividade de neurônios do PVN com a administração central de Suramin ou PPADS em relação ao grupo tratado com veículo. Corroborando este resultado, também se encontra contraditório o papel deste núcleo no comportamento agressivo, enquanto estudos apontam como sendo facilitatório (CONSIGLIO; LUCION, 1996; GAMMIE; NELSON, 2001), outros apontam como inibitório (GIOVENARDI et al., 1998) e outros questionam sua participação (OLAZABAL; FERREIRA, 1997).

Além da avaliação do CM, este estudo demonstrou que a atividade locomotora não foi alterada significativamente após a administração intracerebroventricular de antagonistas ou de agonista de purinoceptores P2. Tal resultado indica que as alterações maternas encontradas não são decorrentes de alterações na atividade locomotora dos animais que receberam a microinjeção destas drogas. Embora estudos que administraram antagonista de receptores P2X diretamente no núcleo accumbens e na área tegmental ventral, obtiveram alterações da atividade locomotora (KRÜGEL et al., 2001; KITTNER et al., 2004), sugerimos que tais resultados sejam divergentes do presente estudo pela administração da droga em regiões cerebrais específicas, por utilizarem animais machos e por administrarem antagonistas em dosagens diferentes.

A nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que demonstra a participação dos receptores P2 nos cuidados maternos e na agressividade contra intruso em roedores lactantes. Assim como inúmeros estudos (DRIESSEN et al., 1994; MOTIN; BENNETT, 1995; FUNK et al., 1997; KITTNER et al., 2004; MENEZES et al., 2011; RODRIGUEZ-ZAYAS et al., 2012; BIANCARDI; BÍCEGO; GARGAGLIONI, 2014; PUSTOVIT et al., 2016), a escolha destes antagonistas clássicos ainda é a primeira opção para avaliar a participação desta família de receptores em diversas funções fisiológicas. Sendo este o primeiro passo, inúmeros

estudos serão necessários para explorar mais detalhadamente a atuação da sinalização purinérgica P2 neste comportamento específico em roedores.

8 CONCLUSÃO

A administração central de antagonistas de receptores purinérgicos P2 em ratas lactantes foi capaz de reduzir os cuidados maternos, reduzir o comportamento de agressividade contra o intruso, reduzir a ativação neuronal em regiões cerebrais envolvidas com o CM, reduzir a concentração plasmática de OT em ratas lactantes, reduzir o ganho de peso da ninhada e não alterar a atividade locomotora.

Deste modo, podemos concluir que receptores purinérgicos P2 participam do comportamento materno e das respostas neuroendócrinas em ratas lactantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBACCHIO, M. P.; CERUTI, S. Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. **Purinergic Signal**, v. 2, n. 4, p. 595-604, 2006.

ABBACCHIO, M. P. et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 3, p. 281-341, 2006.

AGRELL, J.; WOLFF, J. O.; YLÖNEN, H. Counter-Strategies to Infanticide in Mammals: Costs and Consequences. **Oikos**, v. 83, p. 507-517, 1998.

ARCHER, J. **The behavioral biology of aggression**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.

BARANOWSKA-BOSIACKA, I. et al. Effects of perinatal exposure to lead (Pb) on purine receptor expression in the brain and gliosis in rats tolerant to morphine analgesia. **Toxicology**, v. 339, p. 19-33, 2016.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol**, v. 46, p. 575–605, 1995.

BHATIA, S. C. et al. Electrical and chemical stimulation of the same hypothalamic loci in relation to aggressive behaviour in cats: a comparison study. **Indian J Physiol Pharmacol**, v. 39, n. 4, p. 369-76, 1995.

BIANCARDI, V.; BÍCEGO, K. C.; GARGAGLIONI, L. H. ATP in the locus coeruleus as a modulator of cardiorespiratory control in unanaesthetized male rats. **Exp Physiol**, v. 99, n. 1, p. 232-47, 2014.

BJELOBABA, I.; JANJIC, M. M.; STOJILKOVIC, S. S. Purinergic signaling pathways in endocrine system. **Auton Neurosci**, v. 191, p. 102-16, 2015.

BLANCHARD, R. J., BLANCHARD, D. C. **The biology of aggression**. Alphen an den Rijn The Netherlands: Sijhoff and Noordhoff, 1981.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Behavioral correlates of chronic dominance-subordination relationships of male rats in a seminatural situation. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 14, n. 4, p. 455-62, 1990.

BOCCIA, M. L.; PEDERSEN, C. A. Brief vs. long maternal separations in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior and lactation levels of aggression and anxiety. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n. 7, p. 657-72, 2001.

BOSCH, O. J. et al. Release of oxytocin in the hypothalamic paraventricular nucleus, but not central amygdala or lateral septum in lactating residents and virgin intruders during maternal defence. **Neuroscience**, v. 124, p. 439-448, 2004.

BOSCH, O. J. et al. Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety. **J Neurosci**, v. 25, p. 6807–6815, 2005.

BOSCH, O. J. et al. Extracellular amino acid levels in the paraventricular nucleus and the central amygdala in high- and low-anxiety dams rats during maternal aggression: regulation by oxytocin. **Stress**, v. 10, p. 261–270, 2007.

BOSCH, O. J.; NEUMANN, I. D. Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: from central release to sites of action. **Horm Behav**, v. 61, n. 3, p. 293-303, 2012.

BOSCH, O. J. Maternal aggression in rodents: brain oxytocin and vasopressin mediate pup defence. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 28, p. 368 (1631), 2013.

BRAIN, P. F. Differentiating types of attack and defensive in rodents. In: BRAIN, P. F.; BERTON, D. **Multidisciplinary Approaches to Aggression Research**. Amsterdam: Elsevier North-Holland Bioedical, 1981. p. 53-78.

BRIDGES, R. S. et al. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. **Proc Natl Acad Sci**, v. 87, n. 20, p. 8003-7, 1990.

BRIDGES, R. S. et al. Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. **Endocrinology**, v. 138, n. 2, p. 756-63, 1997.

BRIDGES, R. S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Front Neuroendocrinol**, v. 36, p. 178-96, 2015.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, n. 12, p. 1471-83, 2007.

BURNSTOCK, G. et al. Purinergic signaling: From normal behaviour to pathological brain function. **Progress in Neurobiology**, v. 95, p. 229-274, 2011.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: from discovery to current developments. **Exp Physiol**, v. 99, n. 1, p. 16-34, 2014.

BURNSTOCK, G. Physiopathological roles of P2X receptors in the central nervous system. **Curr Med Chem**, v. 22, n. 7, p. 819-44, 2015.

BURNSTOCK, G. Purinergic Mechanisms and Pain. **Adv Pharmacol**, v. 75, p. 91-137, 2016.

BUSNARDO, C. et al. Cardiovascular responses to ATP microinjected into the paraventricular nucleus are mediated by nitric oxide and NMDA glutamate receptors in awake rats. **Exp Physiol**, v. 98, n. 10, p. 1411-21, 2013.

CALAMANDREI, G.; KEVERNE, E. B. Differential expression of Fos protein in the brain of female mice dependent on pup sensory cues and maternal experience. **Behav Neurosci**, v. 108, n. 1, p. 113-20, 1994.

CALDJI, C. et al. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, n. 9, p. 5335-40, 1998.

CARRIVE, P. et al. Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. **Neuroscience**, v. 78, p. 165-77, 1997.

CEZARIO, A. F. et al. Hypothalamic sites responding to predator threats-the role of the dorsal preammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. **Eur J Neurosci**, v. 28, p. 1003-15, 2008.

CHAMPAGNE, F. et al. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen inducible central oxytocin receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 22, p. 12736-41, 2001.

CHAMPAGNE, F. A. et al. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiol Behav**, v. 79, n. 3, p. 359-71, 2003.

CHEN, Z. P.; LEVY, A.; LIGHTMAN, S. L. Activation of specific ATP receptors induces a rapid increase in intracellular calcium ions in rat hypothalamic neurons. **Brain Res**, v. 641, n. 2, p. 249-56, 1994.

CODDOU, C. et al. Activation and Regulation of Purinergic P2X Receptor Channels. **Pharmacol Rev**, v. 63, p. 642-683, 2011.

COLLO, G. et al. Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. **J Neurosci**, v. 16, p. 2495–2507, 1996.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behav Brain Res**, v. 138, n. 1, p. 17-28, 2003.

CONSIGLIO, A. R.; LUCION, A. B. Lesion of hypothalamic paraventricular nucleus and maternal aggressive behavior in female rats. **Physiol Behav**, v. 59, n. 4–5, p. 591–596, 1996.

CONSIGLIO, A. R. et al. Effects of oxytocin microinjected into different areas of the central nervous system on maternal aggressive behavior. **Physiol Behav**, v. 85, p. 354-62, 2005.

CONSIGLIO, A. R.; BRIDGES, R. S. Circulating prolactin, MPOA prolactin receptor expression and maternal aggression in lactating rats. **Behav Brain Res**, v. 197, p. 97-102, 2009.

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

CROWLEY, W. R. Neuroendocrine regulation of lactation and milk production. **Compr Physiol**, v. 5, n. 1, p. 255-91, 2015.

DE ALMEIDA, R. M.; FERREIRA, A.; AGRATI, D. Sensory, hormonal, and neural basis of maternal aggression in rodents. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 17, p. 111-30, 2014.

DELVILLE, Y.; DE VRIES, G. J.; FERRIS, C. F. Neural connections of the anterior hypothalamus and agonistic behavior in golden hamsters. **Brain Behav Evol**, v. 55, p. 53–76, 2000.

DIELENBERG, R. A.; HUNT, G. E.; MCGREGOR, I. S. “When a rat smells a cat”: the distribution of c-fos expression in rat brain following exposure to a predator odor. **Neuroscience**, v. 104, p. 1085–97, 2001.

DOBOLYI, A.; GRATTAN, D. R.; STOLZENBERG, D. S. Preoptic inputs and mechanisms that regulate maternal responsiveness. **J Neuroendocrinol**, v. 26, n. 10, p. 627-40, 2014.

DONHOFFNER, M. E. et al. Intracerebroventricular Oxytocin Self-Administration in Female Rats. **J Neuroendocrinol**, v. 28, n. 10, 2016.

DRIESSEN, B. et al. Antinociceptive effect of intrathecally administered P2-purinoceptor antagonists in rats. **Brain Res**, v. 666, n. 2, p. 182-8, 1994.

ERSKINE, M. S.; BARFIELD, R. J.; GOLDMAN, B. D. Intraspecific fighting during late pregnancy and lactation in rats and effects of litter removal. **Behavior Biology**. v.23, p.206–218, 1978.

FANSELOW, M. S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. **The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization**. New York: Plenum, 1991. p. 151–73.

FEBO, M.; NUMAN, M.; FERRIS, C. R. Functional Magnetic Resonance Imaging Shows Oxytocin Activates Brain Regions Associated with Mother-Pup Bonding during. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 50, p. 11637-11644, 2005.

FEBO, M.; FERRIS, C. F. Oxytocin and vasopressin modulation of the neural correlates of motivation and emotion: results from functional MRI studies in awake rats. **Brain Res**, v. 1580, p. 8-21, 2014.

FERREIRA, A.; HANSEN, S. Sensory control of maternal aggression en *Rattus norvegicus*. **J Comp Psychol**, v. 2, p. 173–177, 1986.

FERREIRA, A. et al. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. **Physiol Behav**, v. 77, n. 2-3, p. 197-204, 2002.

FERREIRA-NETO, H. C.; ANTUNES, V. R.; STERN, J. E. ATP stimulates rat hypothalamic sympathetic neurons by enhancing AMPA receptor-mediated currents. **J Neurophysiol**, v. 114, n. 1, p. 159-69, 2015.

FLEMING, A. S.; WALSH, C. Neuropsychology of maternal behavior in the rat: cfos expression during mother-litter interactions. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, n. 5-7, p. 429–43, 1994.

FLORENZANO, F. et al. Cortical and subcortical distribution of ionotropic purinergic receptor subunit type 1 (P2X(1)R) immunoreactive neurons in the rat forebrain. **Neuroscience**, v. 151, n. 3, p. 791-801, 2008.

FUKUI, M. et al. Antinociceptive effects of intracerebroventricularly administered P2 purinoceptor agonists in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 411, p. 25-31, 2001.

FUNK, G. D. et al. P2 receptor excitation of rodent hypoglossal motoneuron activity in vitro and in vivo: a molecular physiological analysis. **J Neurosci**, v. 17, n. 16, p. 6325-37, 1997.

GAMMIE, S. C.; NELSON, R.J. cFOS and pCREB activation and maternal aggression in mice. **Brain Res**, v. 898, p. 232–241, 2001.

GAMMIE, S. C. Current models and future directions for understanding the neural circuitries of maternal behaviors in rodents. **Behav Cogn Neurosci Rev**, v. 4, n. 2, p. 119-35, 2005.

GEVER, J. R. et al. Pharmacology of P2X channels. **Pflugers Arch**, v. 452, n. 5, p. 513-37, 2006.

GIMÉNEZ-LLORT, L. et al. Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. **Eur J Neurosci**, v. 16, n. 3, p. 547-50, 2002.

GIOVENARDI, M. Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. **Physiol Behav**, v. 63, p. 351–359, 1998.

GIOVENARDI, M. et al. Pup age and aggressive behavior in lactating rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 9, p. 1083-1088, 2000.

GOMES, D. A. et al. Sustained stimulation of vasopressin and oxytocin release by ATP and phenylephrine requires recruitment of desensitization-resistant P2X purinergic receptors. **Am J Physiol Regul Comp Physiol**, v. 297, p. 940-949, 2009.

GOURINE, A. V. et al. Involvement of purinergic signalling in central mechanisms of body temperature regulation in rats. **Br J Pharmacol**, v. 135, n. 8, p. 2047-55, 2002.

GROTA, L. J.; ADER, R. Continuous recording of maternal behaviour in *Rattus norvegicus*. **Animal Behavior**, v. 17, p. 722-729, 1969.

GUBERNICK; D. J.; KLOPFER, R. S. **Parental Care in Mammals**. New York: Plenum Press, 1981.

GUO, W. et al. P2X receptors are differentially expressed on vasopressin- and oxytocin-containing neurons in the supraoptic and paraventricular nuclei of rat hypothalamus. **Histochem Cell Biol**, v. 131, p. 29–41, 2009.

GURIN, V. N. et al. Effect of activation and blockade of central P2X receptors on body temperature. **Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova**, v. 88, n. 6, p. 731-40, 2003.

GUZMAN, S. J.; GEREVICH, Z. P2Y Receptors in Synaptic Transmission and Plasticity: Therapeutic Potential in Cognitive Dysfunction. **Neural Plast**, v. 2016, p. 1207393, 2016.

HALPERN, M.; MARTÍNEZ-MARCOS, A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. **Prog Neurobiol**, v. 70, n. 3, p. 245-318, 2003.

HANSEN, S.; FERREIRA, A. Food intake, aggression, and fear behavior in the mother rat: control by neural systems concerned with milk ejection and maternal behavior. **Behav Neurosci**, v. 100, n. 1, p. 64-70, 1986.

HANSEN, S. Medial hypothalamic involvement in maternal aggression of rats. **Behav Neurosci**, v. 103, n. 5, p. 1035-46, 1989.

HÅRD, E.; HANSEN, S. Reduced fear behavior in the lactating rat. **Physiol Behav**, v. 33, p. 641–643, 1985.

HASEN, N. S.; GAMMIE, S. C. Differential FOS activation in virgin and lactating mice in response to an intruder. **Physiol. Behav**, v. 84, p. 681–695, 2005.

HATTON, G. I.; WANG, Y. F. Neural mechanisms underlying the milk ejection burst and reflex. **Prog Brain Res**. v.170, p.155-66, 2008.

HIRUMA, H.; BOURQUE, C. W. P2 purinoceptor-mediated depolarization of rat supraoptic neurosecretory cells in vitro. **J Physiol**. v.489 (Pt 3), p.805-11, 1995.

INSEL, T. R.; HARBAUGH, C. R. Lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus disrupt the initiation of maternal behavior. **Physiol Behav**, v. 45, n. 5, p. 1033-41, 1989.

JACOBSON, C. D. et al. Effects of small medial preoptic area lesions on maternal behavior: retrieving and nest building in the rat. **Brain Res**, v. 194, n. 2, p. 471-8, 1980.

JOHNS, J. M. et al. The effects of dopaminergic/serotonergic reuptake inhibition on maternal behavior, maternal aggression, and oxytocin in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, n. 4, p. 769-85, 2005.

KAPOOR, J. R.; SLADEK, C. D. Purinergic and adrenergic agonists synergize in stimulating vasopressin and oxytocin release. **J Neurosci**, v. 20, n. 23, p. 8868-75, 2000.

KALINICHEV, M.; ROSENBLATT, J. S.; MORRELL, J. I. The medial preoptic area, necessary for adult maternal behavior in rats, is only partially established as a component of the neural circuit that supports maternal behavior in juvenile rats. **Behav Neurosci**, v. 114, n. 1, p. 196-210, 2000.

KEAY, K. A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 7-8, p. 669-78, 2001.

KITTNER, H. et al. Stimulation of P2Y1 receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y1 receptor-mediated nitric oxide production. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 3, p. 435-44, 2003.

KITTNER, H. et al. P2 receptor-mediated effects on the open field behaviour of rats in comparison with behavioural responses induced by the stimulation of dopamine D2-like and by the blockade of ionotropic glutamate receptors. **Behav Brain Res**, v. 149, n. 2, p. 197-208, 2004.

KITTNER, H. et al. Enhanced food intake after stimulation of hypothalamic P2Y1 receptors in rats: modulation of feeding behaviour by extracellular nucleotides. **Eur J Neurosci**, v. 24, n. 7, p. 2049-56, 2006.

KLAMPFL, S. M.; NEUMANN, I. D.; BOSCH, O. J. Reduced brain CRF receptor activation is required for adequate maternal care and maternal aggression in lactating rats. **Eur. J. Neurosci**, v. 38, p. 2742–2750, 2013.

KLAMPFL, S. M. et al. Brain CRF-binding protein modulates aspects of maternal behavior under stressful conditions and supports a hypo-anxious state in lactating rats. **Horm Behav**, v.84, p.136-44, 2016.

KNOTT, T. K.; VELÁZQUEZ-MARRERO, C.; LEMOS, J. R. ATP elicits inward currents in isolated vasopressinergic neurohypophysial terminals via P2X2 and P2X3 receptors. **Pflugers Arch**, v. 450, n. 6, p. 381-9, 2005.

KNOTT, T. K. et al. Adenosine Triphosphate Appears to Act via Different Receptor in Terminals Versus Somata of the Hypothalamic Neurohypophysial System. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 24, p. 681-789, 2012.

KRUEGER, J. M. et al. ATP and the purine type 2 X7 receptor affect sleep. **J Appl Physiol (1985)**, v. 109, n. 5, p. 1318-27, 2010.

KRÜGEL, U. et al. Stimulation of P2 receptors in the ventral tegmental area enhances dopaminergic mechanisms in vivo. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 8, p. 1084-93, 2001.

KRUK, M. R. et al. Discriminant analysis of the localization of aggression-inducing electrode placements in the hypothalamus of male rats. **Brain Res**, v. 260, n. 1, p. 61-79, 1983.

KRUK, M. R. et al. Comparison of aggressive behaviour induced by electrical stimulation in the hypothalamus of male and female rats. **Prog Brain Res**, v.61, p. 303-14, 1984.

KRUK, M. R. Ethology and pharmacology of hypothalamic aggression in the rat. *Neurosci. Biobehav Rev*, v. 15, p. 527–538, 1991.

LAMMERS, J. H. et al. Hypothalamic substrates for brain stimulation-induced attack, teeth-chattering and social grooming in the rat. **Brain Res**, v. 449, n. 1-2, p. 311-27, 1988.

LEDENT, C. et al. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. **Nature**, v. 388, n. 6643, p. 674-8, 1997.

LEDESMA, J et al. Maternal aggression in human beings. **New Trends in Experimental and Clinical Psychiatry**, v. 4, p. 223-228, 1988.

LEE, A.; CLANCY, S.; FLEMING, A. S. Mother rats bar-press for pups: effects of lesions of the mpoa and limbic sites on maternal behavior and operant responding for pup-reinforcement. **Behav Brain Res**, v. 108, n. 2, p. 215-31, 2000.

LIN, D. et al. Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. **Nature**, v. 470, p. 221-226, 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. **The Journal of the Neuroscience**, v. 17, n. 9, p. 3364-3378, 1997.

LONSTEIN, J. S. et al. Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats. **Neuroscience**, v. 81, n. 1, p. 267-281, 1998.

LONSTEIN, J. S.; SIMMONS, D. A.; STERN, J. M. Functions of the caudal periaqueductal gray in lactating rats: kyphosis, lordosis, maternal aggression, and fearfulness. **Behav Neurosci**, v. 112, p. 1502-18, 1998.

LONSTEIN, J. S.; GAMMIE, S. C. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, p. 869–888, 2002.

LONSTEIN, J. S. Resolving apparent contradictions concerning the relationships among fear or anxiety and aggression during lactation: theoretical comment on D'Anna, Stevenson, and Gammie. **Behav Neurosci**, v. 119, n. 4, p. 1165-8, 2005.

MASAKI, E. et al. P2-purinergic receptor antagonists reduce the minimum alveolar concentration of inhaled volatile anesthetics. **Brain Res**, v. 864, n. 1, p. 130-3, 2000.

MAYER, A. D.; ROSENBLATT, J. S. Hormonal factors influence the onset of maternal aggression in laboratory rats. **Horm Behav**, v. 21, n. 2, p. 253-67, 1987.

MCGREGOR, I. S. et al. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. **J Neurosci**, v. 24, p. 4134–44, 2004.

MENEZES, M. F. et al. Purinergic mechanisms of lateral parabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. **Brain Res**, v. 1372, p. 49-58, 2011.

MIRANDA-PAIVA, C. M. et al. A role for the periaqueductal grey in opioidergic inhibition of maternal behavior. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 667-674, 2003.

MORI, M.; TSUSHIMA, H.; MATSUDA, T. Antidiuretic effects of purinoceptor agonists injected into the hypothalamic paraventricular nucleus of water-loaded, ethanol-anesthetized rats. **Neuropharmacology**, v. 31, n. 6, p. 585-92, 1992.

MOTIN, L.; BENNETT, M. R. Effect of P2-purinoceptor antagonists on glutamatergic transmission in the rat hippocampus. **Br J Pharmacol**, v. 115, n. 7, p. 1276-80, 1995.

MOTTA, S. C. et al. Ventral premammillary nucleus as a critical sensory relay to the maternal aggression network. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 35, p. 14438-43, 2013.

NEUMANN, I. et al. Simultaneous microdialysis in blood and brain: oxytocin and vasopressin release in response to central and peripheral osmotic stimulation and suckling in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 58, n. 6, p. 637-45, 1993.

NEUMANN, I. D. et al. Brain oxytocin inhibits basal and stress-induced activity of the hypothalamopituitary-adrenal axis in male and female rats: partial action within the paraventricular nucleus. **J Neuroendocrinol**, v. 12, p. 235–243, 2000.

NORTH, R. A. P2X receptors. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 371, n. 1700, 2016.

NUMAN, M. Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. **J Comp Physiol Psychol**, v. 87, n. 4, p. 746-59, 1974.

NUMAN, M.; ROSENBLATT, J. S.; KOMISARUK, B. R. Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. **J Comp Physiol Psychol**, v. 91, n. 1, p. 146-64, 1977.

NUMAN, M. et al. Axon-sparing lesions of the preoptic region and substantia innominata disrupt maternal behavior in rats. **Behav Neurosci**, v. 102, n. 3, p. 381-96, 1988.

NUMAN, M. Maternal behavior. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York: Raven Press, 1994. cap. 37, p. 221-302.

NUMAN, M.; NUMAN, M. A lesion and neuroanatomical tract-tracing analysis of the role of the bed nucleus of the stria terminalis in retrieval behavior and other aspects of maternal responsiveness in rats. **Dev Psychobiol**, v. 29, n. 1, p. 23-51, 1996.

NUMAN, M.; NUMAN, M. J. Projection sites of medial preoptic area and ventral bed nucleus of the stria terminalis neurons that express Fos during maternal behavior in female rats. **J Neuroendocrinol**, v. 9, n. 5, p. 369-84, 1997.

NUMAN, M. et al. Expression of c-fos, fos B, and egr-1 in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis during maternal behavior in rats. **Brain Res**, v. 792, n. 2, p. 348-52, 1998.

NUMAN, M.; INSEL, T. R. **The neurobiology of parental behavior**. New York: Springer-Verlag, 2003.

NUMAN, M.; STOLZENBERG, D. S. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. **Front Neuroendocrinol**, v. 30, n. 1, p. 46-64, 2009.

NUMAN, M. Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. **Dev Psychobiol**, v. 49, n. 1, p. 12-21, 2007.

NUMAN, M.; WOODSIDE, B. Maternity: neural mechanisms, motivational processes, and physiological adaptations. **Behav Neurosci**, v. 124, n. 6, p. 715-41, 2010.

OLAZABAL, D. E.; FERREIRA, A. Maternal behavior in rats with kainic acid-induced lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. **Physiol Behav**, v. 61, n. 5, p. 779-84, 1997.

OLAZÁBAL, D. E. et al. New theoretical and experimental approaches on maternal motivation in mammals. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 37, n. 8, p. 1860-74, 2013.

OLIVIER, B.; MOS, J.; VAN OORSCHOT, R. Maternal aggression in rats: effects of chlordiazepoxide and fluprazine. **Psychopharmacology**, v. 86, p. 68–76, 1985.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 3.ed. San Diego: Academic Press, 1997.

PEDERSEN, C. A. et al. Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats. **Science**, v. 216, n. 4546, p. 648-50, 1982.

PEDERSEN, C. A. et al. Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental and medial preoptic areas. **Behav Neurosci**, v. 108, n. 6, p. 1163-71, 1994.

PEDERSEN, C. A.; BOCCIA, M. L. Oxytocin links mothering received, mothering bestowed and adult stress responses. **Stress**, v. 5, p. 259 –267, 2002.

PEDERSEN, C. A.; BOCCIA, M. L. Oxytocin antagonism alters rat dams' oral grooming and upright posturing over pups. **Physiol Behav**, v. 80, n. 2-3, p. 233-41, 2003.

PEREIRA, M. et al. Motivational aspects of maternal anxiolysis in lactating rats. **Psychopharmacology**, v. 180, p. 241–248, 2005.

PEREIRA, M. et al. Effect of the adenosine A2A receptor antagonist MSX-3 on motivational disruptions of maternal behavior induced by dopamine antagonism in the early postpartum rat. **Psychopharmacology**, v. 213, n. 1, p. 69-79, 2011.

PEREIRA, V. S. et al. Antidepressant- and anticompulsive-like effects of purinergic receptor blockade: involvement of nitric oxide. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 23, n. 12, p. 1769-78, 2013.

PEREIRA, A. S.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F. C. Central corticosterone disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. **Neurosci Lett**, v. 606, p. 88-93, 2015.

POPESKI, N.; WOODSIDE, B. Central nitric oxide synthase inhibition disrupts maternal behavior in the rat. **Behav Neurosci**, v. 118, n. 6, p. 1305–1316, 2004.

PUSTOVIT, K. B.; KUZMIN, V. S.; ABRAMOCHKIN, D. V. Diadenosine tetra- and pentaphosphates affect contractility and bioelectrical activity in the rat heart via P2 purinergic receptors. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 389, n. 3, p. 303-13, 2016.

ROBERTS, W. W.; NAGEL, J. First-order projections activated by stimulation of hypothalamic sites eliciting attack and flight in rats. **Behav Neurosci**, v. 110, n. 3, p. 509-27, 1996.

RODRÍGUEZ-ZAYAS, A. E. et al. Blockade of P2 nucleotide receptors after spinal cord injury reduced the gliotic response and spared tissue. **J Mol Neurosci**, v. 46, n. 1, p. 167-76, 2012.

ROSENBLAT, J. S.; MAYER, A. D.; SIEGEL, H. I. Maternal behavior among the nonprimate mammals. In: ADLER, N.; PFAFF, D.; GOY, R. W. **Handbook of Behavioral neurobiology Reproduction**. New York: Plenum Press, 1985. v. 7, p. 229-298.

SCALIA, F.; WINANS, S. S. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. **J Comp Neurol**, v. 161, n. 1, p. 31-55, 1975.

SEIDEL, B. et al. Expression of purinergic receptors in the hypothalamus of the rat is modified by reduced food availability. **Brain Research**, p. 143-152, 2006.

SERGEEVA, O. A. et al. P2Y receptor-mediated excitation in the posterior hypothalamus. **Eur J Neurosci**, v. 24, n. 5, p. 1413-26, 2006.

SHAHROKH, D. K. et al. Oxytocin-dopamine interactions mediate variations in maternal behavior in the rat. **Endocrinology**, v. 151, n. 5, p. 2276-86, 2010.

SHIBUYA, I. et al. Evidence that multiple P2X purinoceptors are functionally expressed in rat supraoptic neurones. **J Physiol**, v. 514 (Pt 2), p. 351–367, 1999.

SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. **J Comp Neurol**, v. 270, n. 2, p. 209-42, 1988.

SONG, Z.; VIJAYARAGHAVAN, S.; SLADEK, C. D. ATP increases intracellular calcium in supraoptic neurons by activation of both P2X and P2Y purinergic receptors. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, p. R423–R431, 2007.

SONG, Z.; GOMES, D. A.; STEVENS, W. Role of purinergic P2Y1 receptors in regulation of vasopressin and oxytocin secretion. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 297, n. 2, p. R478-84, 2009.

SONG, X. et al. Regional expression of P2Y4 receptors in the rat central nervous system. **Purinergic Signalling**, v. 7, p. 469–488, 2011.

SPERLÁGH, B. et al. Local regulation of vasopressin and oxytocin secretion by extracellular ATP in the isolated posterior lobe of the rat hypophysis. **J Endocrinol**, v. 160, p. 343–350, 1999.

STACK, E. C. et al. A functional neuroanatomical investigation of the role of the medial preoptic area in neural circuits regulating maternal behavior. **Behav Brain Res**, v. 131, n. 1-2, p. 17-36, 2002.

STAPLES, L. G. et al. Neural activation during cat odor-induced conditioned fear and 'trial 2' fear in rats. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, p. 1265–77, 2005.

STECULORUM, S. M. et al. Hypothalamic UDP Increases in Obesity and Promotes Feeding via P2Y6-Dependent Activation of AgRP **Neurons. Cell**, v. 162, n. 6, p. 1404-17, 2015.

STERN, J. M. Offspring-induced Nurturance: Animal-Human Parallels. **Rev Psychobiol**, v. 31, p. 19-37, 1997.

STOJILKOVIC, S. S. Purinergic regulation of hypothalamopituitary functions. **Trends Endocrinol Metab**, v. 20, n. 9, p. 460-8, 2009.

SUKIKARA, M. H. et al. The periaqueductal gray and its potential role in maternal behavior inhibition in response to predatory threats. **Behav Brain Res**, v. 209, n. 2, p. 226-33, 2010.

SWANSON, L. W. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. **Brain Res**, v. 886 p. 113–64, 2000.

TROADEC, J. D. et al. ATP-evoked increases in $[Ca^{2+}]_i$ and peptide release from rat isolated neurohypophysial terminals via a P2X2 purinoceptor. **J Physiol**, v. 511 (Pt 1), p. 89-103, 1998.

TSUDA, M. P2 receptors, microglial cytokines and chemokines, and neuropathic pain. **J Neurosci Res**, v. 95, n. 6, p. 1319-1329, 2017.

USHIJIMA, I.; KATSURAGI, T.; FURUKAWA, T. Involvement of adenosine receptor activities in aggressive responses produced by clonidine in mice. **Psychopharmacology**, v. 83, n. 4, p. 335-9, 1984.

VAN LEENGOED, E.; KERKER, E.; SWANSON, H. H. Inhibition of post-partum maternal behaviour in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. **J Endocrinol**, v. 112, n. 2, p. 275-82, 1987.

VAVRA, V.; BHATTACHARYA, A.; ZEMKOVA, H. Facilitation of glutamate and GABA release by P2X receptor activation in supraoptic neurons from freshly isolated rat brain slices. **Neuroscience**, v. 188, n. 1-12, 2011.

VERONESI, V. B. **Influência da dipirona sódica sobre as respostas comportamentais em camundongos fêmeas lactantes e a repercussão nos filhotes adolescentes.** 2016. 86f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicada à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2016.

VILELA, F.; GIUSTI-PAIVA, A. Glucocorticoids Disrupt Neuroendocrine and Behavioral Responses during Lactation. **Neuroendocrinology**, v. 152, n. 12, p. 4838-4845, 2011.

VILELA, F. C.; RUGINSK, S. G.; DE MELO, C. M.; GIUSTI-PAIVA, A. The CB1 cannabinoid receptor mediates glucocorticoid-induced effects on behavioural and neuronal responses during lactation. **Pflugers Arch**, v. 465, n. 8, p. 1197-207, 2013.

WEISNER, B. P.; SHEARD, N. M. **Maternal behavior in the rat.** London: Oliver and Boyd, 1933.

WENG, Z.J. et al. Effect of electroacupuncture on P2X3 receptor regulation in the peripheral and central nervous systems of rats with visceral pain caused by irritable bowel syndrome. **Purinergic Signal**, v. 11, n. 3, p. 321-9, 2015.

WINDLE, R. J. et al. Oxytocin attenuates stress-induced c-fos mRNA expression in specific forebrain regions associated with modulation of hypothalamo– pituitary– adrenal activity. **J Neurosci**, v. 24, p. 2974-2982, 2004.

WORTHINGTON, R. A. et al. Identification and localisation of ATP P2X receptors in rat midbrain. **Electrophoresis**, v. 20, n. 10, p. 2077-80, 1999.

XIANG, Z. et al. Localization of ATP-gated P2X2 receptor immunoreactivity in the rat hypothalamus. **Brain Res**, v. 813, p. 390–397, 1998.

XIANG, Z.; HE, C.; BURNSTOCK, G. P2X5 receptors are expressed on neurons containing arginine vasopressin and nitric oxide synthase in the rat hypothalamus. **Brain Res**, v. 1099, n. 1, p. 56-63, 2006.

XIAO, Z.; LI, Y. Y.; SUN, M. J. Activation of P2X7 receptors in the midbrain periaqueductal gray of rats facilitates morphine tolerance. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 135, p. 145-53, 2015.

YU, Y. et al. Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. **Brain Res**, v. 1194, p. 45-55, 2008.

ANEXO A – Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas - MG.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 13 de maio de 2013.

Prof. Alexandre Giusti Paiva

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 511/2013, intitulado “Participação dos receptores purinérgicos no comportamento maternal e nas funções neuroendócrinas de ratas lactantes” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento
Presidente da CEUA – Unifal-MG

ANEXO B – Artigo científico.

Pharmacology, Biochemistry and Behavior 158 (2017) 1–6



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh

P2 purinergic receptor antagonists disrupt maternal behavior in lactating rats



Luciana C. Teodoro, Layla D.M. Cabral, Fabiana C. Vilela, Alexandre Giusti-Paiva*

Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas-MG, Alfenas, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Lactation
Maternal behavior
P2 purinergic receptor
Oxytocin
Suramin
PPADS

ABSTRACT

The involvement of purinergic signaling in several brain functions has been recognized, but the modulation on maternal behavior by the purinergic system is not established, even though there are functional interactions between the purinergic and oxytocinergic systems. Therefore, the aim of our study was to investigate whether central administration of P2 receptor antagonists affected the maternal behavior of lactating rats and c-Fos immunoreactivity in the forebrain. On day 7 of lactation, female rats were treated with vehicle (5 μ l; i.c.v.), suramin (9.4–75.0 μ g/5 μ l; i.c.v.) or PPADS (9.4–75.0 μ g/5 μ l; i.c.v.) 30 min before the experiment began. The maternal behavior was evaluated during the 30 min following suramin or PPADS administration. In addition, c-Fos-positive nuclei were counted in the medial preoptic area (MPOA) and in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST), and neurons that were double-labeled for c-Fos/OT were counted in the paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON) of the hypothalamus of lactating rats. The results show that P2 receptor antagonists decreased maternal care and decreased neuronal activation in the MPOA and BNST and activation of oxytocinergic neurons in hypothalamic nuclei. Our results indicate that the purinergic system modulates maternal behavior and neuronal activation induced by suckling during lactation.

1. Introduction

Extracellular nucleotides and nucleosides have been identified as important classes of signaling molecules participating in diverse functions of neuronal and non-neuronal tissues (Cisneros-Mejorado et al., 2015), and they exert their biological function by the activation of cell surface P1 and P2 receptors. The P1 receptors (A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3 subtypes) exhibit a relatively high affinity for adenosine in contrast to adenosine 5'-triphosphate (ATP) (Cunha, 2016) and couple to G proteins, while P2 receptors have a high affinity for ATP in contrast to adenosine (Ralevic and Burnstock, 1998). The vesicular release of ATP, which is co-stored with classic transmitters such as acetylcholine, norepinephrine, and serotonin (Burnstock, 1986), and the outflow of endogenous purines occur in response to neuronal activity (Cunha et al., 1996). There is evidence that central purinergic signaling is involved in normal behavior, including sleep and arousal (adenosine as an endogenous sleep-promoting substance), learning and memory, feeding behavior, mood and motivation, and pain (Krueger et al., 2010; Burnstock et al., 2011; Burnstock, 2016). P2 antagonists reduced food intake (Kittner et al., 2006); reduced percentage time spent on open arms in elevated plus-maze (Kittner et al., 2003), blocked

behavioral and neuroendocrine response to conditioned fear stimuli (Zou et al., 1998), and decreased the central enhancement of pain caused by peripheral injury (Wu et al., 2004). However, less is known about the involvement of purinergic signaling on maternal behavior, which constitutes a set of behavioral responses displayed by the female that specifically support the development and growth of her offspring (Bridges, 2015). It has been demonstrated that A_{2A} receptor antagonists can reverse haloperidol-induced deficits in maternal behavior (Pereira et al., 2011); however, there is a lack of evidence of the involvement of P2 receptors in maternal behavior.

Immunohistochemical studies have demonstrated the presence of P2 purinergic receptors in several areas of the central nervous system (CNS) involved in maternal behavior, including the medial preoptic area (MPOA) and bed nucleus of the stria terminalis (Xiang et al., 1998; Gurin et al., 2002; Xiang et al., 2006; Song et al., 2011; Florenzano et al., 2008; Burnstock, 2015). Furthermore, evidence has also been presented that multiple P2 receptor subtypes are expressed in the paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON) of the hypothalamus of rats (Shibuya et al., 1999; Guo et al., 2009; Bjelobaba et al., 2015; Song et al., 2007; Song et al., 2009; Song et al., 2011).

Given the presence of purinergic receptors in central sites that are

* Corresponding author at: Laboratório de Fisiologia Translacional, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas-MG, Campus Santa Clara, Av. Jovino Fernandes Sales 2600, Prédio F Sala 300, Alfenas 37130-000, MG, Brazil.

E-mail addresses: agiusti@unifal-mg.edu.br (A. Giusti-Paiva).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2017.05.006>

Received 8 March 2017; Received in revised form 11 May 2017; Accepted 15 May 2017

Available online 15 May 2017

0091-3057/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

implicated in maternal behavior and the lack of knowledge regarding the participation of purinergic signaling in this behavior, the aim of this study was to investigate the influence of the central administration of P2 receptor antagonists on maternal motivation during lactation. In addition, we verified c-Fos immunoreactivity in oxytocinergic neurons in the PVN and SON of the hypothalamus and in areas that are directly related to the onset and expression of maternal behavior.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult Wistar nulliparous female rats 9 weeks of age (220–250 g) were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Alfnas and were housed in a temperature-controlled room (22 °C) on a 12 h light–12 h dark cycle (lights on at 7:00 a.m.), with access to water and food ad libitum. In all experiments, the females were timed-mated by placing them with sexually experienced males. The day when sperm was observed in the vaginal lavage was designated day 1 of pregnancy. Pregnant females were individually housed in opaque polypropylene cages (42 × 34 × 16 cm). On the second postpartum day (PND), offspring were randomly culled to 8 pups each (four female and four male) and stereotaxic surgery was performed on mothers. All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki on the welfare of experimental animals and with the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Alfnas (#511/2013).

2.2. Surgery

On the morning of PND2, female rats were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg body weight, i.p.) and then placed in a stereotaxic apparatus (Kopf Instruments, Kent, UK). A stainless steel guide cannula (25 G, length 12 mm) was unilaterally implanted 2 mm above the right lateral ventricle (LV), based on the coordinates from the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1997): 0.5 mm caudal to bregma, 1.5 mm lateral to the midline, and 3.6 mm below the dura mater. The cannula was secured to the top of the skull with dental acrylic resin and two jeweler's screws. After surgery, the rats received an injection of ketoprofen (3 mg/animal) and were returned to the housing cage along with their pups, as previously described (Pereira et al., 2015).

2.3. Drug and intracerebroventricular infusions

The infusion of vehicle, suramin or pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid (PPADS) was performed on PND7 30 min before the behavioral tests. Suramin and PPADS, purchased from Sigma–Aldrich, were dissolved in a solution containing 0.9% NaCl (vehicle). For all experiments, lactating rats were infused with vehicle (5 µL; i.c.v.), suramin (9.4, 18.8, 37.5 and 75.0 µg/5 µL; i.c.v.) or PPADS (9.4, 18.8, 37.5 and 75.0 µg/5 µL; i.c.v.). Doses and method of administration were chosen based on previous studies (de Faria et al., 2009; Masaki et al., 2000; Ong et al., 1997).

2.4. Experimental procedures

Maternal Behavior: Maternal behavior was assessed on the morning of PND7, between 08:00 and 12:00 h. Initially, on the night of PND6 of lactation, the position of the nest in the home cage was recorded, and the litter was removed from the cage and placed in another cage for 10 h with the temperature controlled at 30 °C (Vilela and Giusti-Paiva, 2011). At 30 min before behavioral tests, dams (n = 8–11 per group) were treated with vehicle (5 µL; i.c.v.), suramin (9.4; 18.8; 37.5 or 75.0 µg/5 µL; i.c.v.) or PPADS (9.4; 18.8; 37.5 or 75.0 µg/5 µL; i.c.v.). The pups were placed back in their home cages on the side opposite the location of the previous nest, and the dam's behavior was filmed for the

next 30 min. We analyzed the following parameters: latency to retrieve each pup, time spent licking pups, percentage of time spent arched-nursing, percentage of time spent blanket-nursing, and percentage of full maternal behavior (which is determined by the mother staying in the arched-nursing position for 2 min after nursing) (Vilela and Giusti-Paiva, 2011; Pereira et al., 2015).

Open field test: To evaluate locomotor activity, another set of lactating female rats (n = 7–12 per group) was treated with vehicle (5 µL; i.c.v.), suramin (9.4; 18.8; 37.5 or 75.0 µg/5 µL; i.c.v.) or PPADS (9.4; 18.8; 37.5 or 75.0 µg/5 µL; i.c.v.). After 30 min, each female rat was placed in the center of the open field (circular arena with a diameter 60 cm and walls of 45 cm high with a floor is divided into 16 areas) and for 5 min the performance of animals was recorded by a video camera for further analysis (Vilela et al., 2013).

Immunohistochemistry: After 90 min of evaluation of the maternal behavior, dams treated with vehicle (5 µL), suramin (dose of 37.5 µg/5 µL) or PPADS (dose of 37.5 µg/5 µL) were deeply anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg; i.p.). Next, they were perfused with 200 mL cold 0.9% NaCl solution containing heparin (50 UI/L), followed by 500 mL 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.2. The brains were removed, post-fixed for 4 h in the perfusion solution and stored at 4 °C in PB containing 30% sucrose. A cryostat was used to collect 30-µm-thick coronal sections in 0.01 M PB. Subsequently, immunohistochemical procedures were performed for c-Fos/oxytocin double-labeled neurons in the PVN and SON, and c-Fos immunoreactivity in the MPOA and BNST, as previously described (Vilela and Giusti-Paiva, 2014; Pereira et al., 2015). Sections were processed for Fos immunoreactivity by incubating overnight at room temperature with rabbit anti-Fos antibody (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) and diluted 1:10,000 in 0.1 M phosphate buffer (PB) containing 2% normal goat serum and 0.3% Triton X-100. Free-floating sections were washed with PB and incubated first with goat biotin-labeled anti-rabbit immunoglobulin (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA, 1:200 dilution in 1.5% normal goat serum-PB) and then with avidin–biotin–peroxidase complex (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA, 1:200 in PB) for 1 h at room temperature. Immunoperoxidase labeling was detected using diaminobenzidine hydrochloride (DAB, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) intensified with 1% cobalt chloride and 1% nickel ammonium sulphate, which generates a blue–black reaction product. Next, the sections were incubated for 48 h at 4 °C with rabbit anti-OT (Peninsula Lab. Inc., USA, 1:10,000). Then, sections were rinsed and subjected to the protocol described above, except that non-intensified DAB, which generates an insoluble brown reaction product, was used. The sections were mounted on gelatinized slides, air-dried overnight, dehydrated, cleared in xylene and placed under a cover slip with Entellan (New Jersey, USA).

2.5. Statistical analysis

The data were plotted using the GraphPad software program (version 6.0) and expressed as the means ± S.E.M. The pup retrieval data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures followed by the Tukey's post hoc test. The statistically significant differences between groups in behavior tests and the number of c-Fos-labeled neurons were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Dunnett's post hoc test. A p-value of < 0.05 (p < 0.05) was used to establish significance.

3. Results

Analysis of maternal behaviors demonstrated that i.c.v. administration of suramin impaired nest building compared to the vehicle group (Fig. 1A). In addition, suramin at doses of 18.8, 37.5 and 75.0 µg/5 µL decreased the time spent licking pups ($F_{4,42} = 6.85$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively, Fig. 1B), decreased the percentage of arched-nursing position ($F_{4,42} = 12.12$, $p < 0.001$,

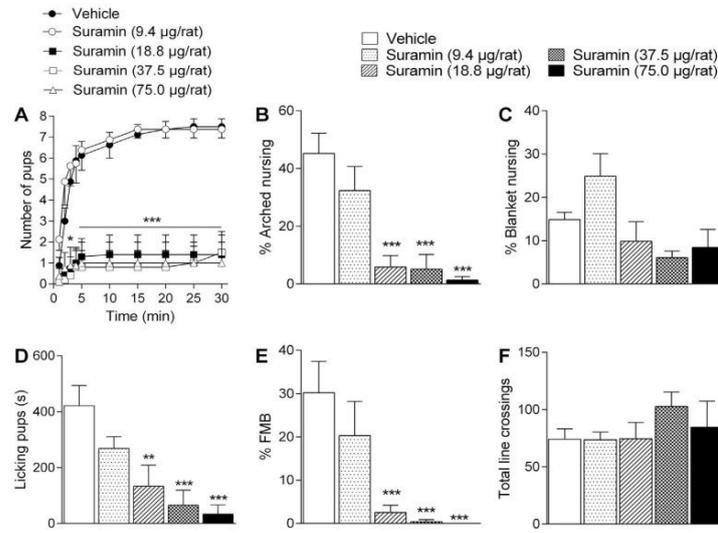


Fig. 1. Effect of treatment with vehicle (5 µl; i.c.v.) or suramin (9.4, 18.8, 37.5 and 75.0 µg/5 µl; i.c.v.) in lactating rats (n = 8–10 per group) on maternal behavior [(A) pup retrieval, (C) percentage of time spent in arched-nursing, (B) time spent licking pups, (D) percentage of full maternal behavior and (E) percentage of time spent in blanket-nursing] and on total number of line crossings in the open field test (F). Each column represents the mean (± S.E.M.). *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 compared with the vehicle group.

p < 0.001 and p < 0.001, respectively, Fig. 1C) and decreased the percentage of full maternal behavior ($F_{4,42} = 8.93$, p < 0.001, p < 0.001 and p < 0.001, respectively, Fig. 1D) compared with the vehicle group. The suramin infusion did not interfere with the percentage of blanket-nursing positions ($F_{4,42} = 3.77$, p > 0.05, Fig. 1E).

Fig. 2 shows that i.c.v. administration of PPADS impaired nest building compared to the vehicle group (Fig. 2A). In addition, PPADS at doses of 37.5 and 75.0 µg/5 µL decreased the time spent licking pups ($F_{4,54} = 17.01$, p < 0.001 and p < 0.001, respectively, Fig. 2B) compared with the vehicle group. The PPADS at a dose of 75.0 µg/5 µL decreased the percentage of arched-nursing position ($F_{4,54} = 8.60$,

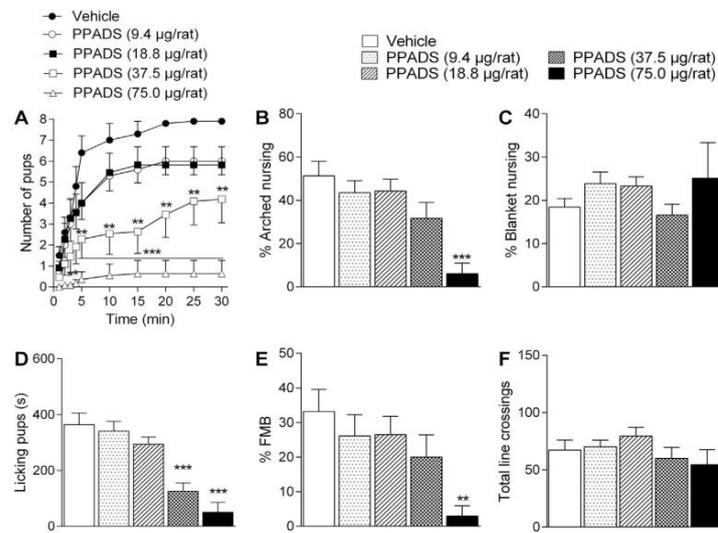


Fig. 2. Effect of treatment with vehicle (5 µl; i.c.v.) or PPADS (9.4, 18.8, 37.5 and 75.0 µg/5 µl; i.c.v.) in lactating rats (n = 8–10 per group) on maternal behavior [(A) pup retrieval, (C) percentage of time spent in arched-nursing, (B) time spent licking pups, (D) percentage of full maternal behavior and (E) percentage of time spent in blanket-nursing], and on total number of line crossings in the open field test (F). Each column represents the mean (± S.E.M.). *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 compared with the vehicle group.

Table 1
Effect of suramin or PPADS treatments on the absolute number of c-Fos labeled neurons in the MPOA, BNST, SON and PVN, number of OT labeled neurons or c-Fos/OT double labeled neurons in the SON and PVN.

	Vehicle	Suramin	PPADS
c-Fos			
MPOA	147.9 ± 12.8	84.4 ± 11.0**	69.4 ± 9.3***
BNST	64.5 ± 6.1	38.1 ± 6.0**	21.0 ± 2.9***
SON	11.2 ± 1.9	4.2 ± 1.6*	3.8 ± 1.5*
PVN	16.5 ± 2.8	10.5 ± 2.8	5.4 ± 1.5**
OT neurons			
SON	55.7 ± 2.5	51.4 ± 2.3	60.8 ± 2.5
PVN	63.3 ± 2.3	62.5 ± 1.4	67.5 ± 4.0
c-Fos/OT			
SON	4.1 ± 0.6	1.1 ± 0.4***	0.7 ± 0.3***
PVN	3.3 ± 0.4	1.1 ± 0.4**	0.6 ± 0.2***

Data are expressed as the mean ± SEM (n = 8–10 rats/group). MPOA: medial preoptic area; BNST: bed nucleus of the stria terminalis; SON: supraoptic nucleus; PVN: paraventricular nucleus; OT: oxytocin.

* p < 0.05 compared to the vehicle group.

** p < 0.01 compared to the vehicle group.

*** p < 0.001 compared to the vehicle group.

p < 0.001 Fig. 2C) and decreased the percentage of full maternal behavior ($F_{4,54} = 4.19$, p < 0.01 Fig. 2D) compared with the vehicle group. The PPADS infusion did not interfere with the percentage of blanket-nursing position ($F_{4,54} = 0.76$, p > 0.05, Fig. 2E). Both suramin and PPADS increase non-maternal behavior, including rearing, self-grooming and exploration (data not shown).

No significant differences were observed in the total number of entries in the open field test in the suramin groups ($F_{4,45} = 1.76$, p = 0.15, Fig. 1F) and PPADS groups ($F_{4,44} = 1.15$, p = 0.34, Fig. 2F) compared with the vehicle group. This result indicates that P2 receptor purinergic antagonists did not interfere with the exploratory activity of lactating rats.

The effects of suramin and PPADS infusion on the immunoreactivity of c-Fos and c-Fos/oxytocin are summarized in Table 1. Treatment with suramin or PPADS reduced c-Fos immunoreactivity in the MPOA ($F_{2,27} = 9.91$, p < 0.01 and p < 0.001, respectively) and reduced c-Fos immunoreactivity in the BNST ($F_{2,30} = 18.01$, p < 0.01 and p < 0.001, respectively), and in the SON ($F_{2,31} = 6.13$, p < 0.05). PPADS reduced c-Fos immunoreactivity in the PVN ($F_{2,31} = 5.01$, p < 0.01) compared to the vehicle group. In addition, treatment with suramin or PPADS significantly decreased the number of c-Fos/OT double-labeled neurons in the PVN ($F_{2,31} = 8.39$, p < 0.01) and in the SON ($F_{2,31} = 7.90$, p < 0.01) compared to the vehicle group. Representative coronal sections of the different groups showing the patterns of c-Fos in the MPOA, in the BNST and c-Fos/OT immunoreactivity in the PVN and SON are presented in Fig. 3.

4. Discussion

The present study demonstrates that central administration of P2 antagonists suramin or PPADS impaired maternal behavior and reduced c-Fos expression in MPOA, BNST, PVN and SON, including oxytocinergic neurons in the PVN and SON, but did not decrease locomotory activity in lactating rats.

Mammals in their maternal phase exhibit a range of offspring-directed behaviors. In laboratory rodents, there are several maternal parameters that are studied, including pup retrieval, which is said to be indicative of maternal motivation. Furthermore, licking pups is an important measure of the quality of maternal care; it not only helps to keep the pups clean and to promote urination/defecation, but it also has a high impact on their emotional and social development (Caldji et al., 1998; Champagne et al., 2003). To provide the offspring with milk, the mother nurses in different nursing positions, including lying on top of

the pups (blanket nursing posture) and arched-nursing (also referred to as “crouching”). Arched-nursing is the only active nursing position where the dam is fully engaged in a quiescent kyphotic posture (Caldji et al., 1998; Pedersen and Boccia, 2003; Olazábal et al., 2013). In searching for brain regions involved in maternal care by measuring the neuronal activation either in comparison with non-lactating conspecifics or in response to mother–pup interaction, previous studies in rats revealed that Fos-expression generally increases in the MPOA during lactation (Lonstein et al., 1998; Matsushita et al., 2015), and a further rise is seen when the mother interacts with the pups (Numan, 1994; Numan and Stolzenberg, 2009; Olazábal et al., 2013). Other regions with increased neuronal activation during mother–pup interactions are the BNST, and lesions to the lateral connection between the BNST and MPOA disrupt maternal behavior (Numan, 1994; Neumann, 2007). In this study, the administration of P2 antagonists (suramin or PPADS) impair maternal behavior simultaneously to reduce the c-Fos expression in MPOA and BNST, suggesting that purinergic signaling modulates several cerebral areas of circuits regulating certain aspects of maternal behavior in rats.

Previous reports show that oxytocin is released within the MPOA and BNST of lactating rats during mother–pup interactions and show how this release contributes to the display of maternal behavior (Perrin et al., 2007; Numan and Stolzenberg, 2009; Bosch et al., 2010; Bridges, 2015). Furthermore, it is also possible that MPOA projections to the PVN promote OT release from the pituitary as part of the milk-ejection reflex (Febo et al., 2005). In addition, several studies show the involvement of purinergic receptors in the release of neuropeptides in the hypothalamic neurohypophysial system (Troadee et al., 1998; Song et al., 2009; Gomes et al., 2009; Custer et al., 2012). It has also been shown that ATP induces a rapid increase in intracellular Ca^{2+} concentrations in the hypothalamic neurosecretory neurons and stimulates hormone release, such as oxytocin (Chen et al., 1994; Song et al., 2007). Furthermore, there is evidence of possible interaction between the oxytocinergic and purinergic systems in the rat hypothalamus (Mori et al., 1992; Gourine et al., 2002; Kapoor and Sladek, 2000; Gomes et al., 2009).

Within this context, oxytocin is considered not only as a hormone that is secreted from the neurohypophysis but also as a neurotransmitter that is released at synapses in the brain (Moos et al., 1989; Gimpl and Fahrenholz, 2001). Several studies that have shown a reduction in oxytocin levels by drug administration also show a reduction in maternal behavior. Systemic dexamethasone injected on 7 day of lactation reduced maternal motivation and disrupted suckling-induced systemic oxytocin secretion in lactating rats (Vilela and Giusti-Paiva, 2011). Likewise, central corticosterone reduced maternal care and plasma levels of oxytocin during lactation (Pereira et al., 2015). In addition, the administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonists reduced maternal care and oxytocin plasma levels in lactating rats (Vilela and Giusti-Paiva, 2011). Similarly, in the present study, the reduction of maternal behavior by P2 antagonists was accompanied by a reduced number of c-Fos/oxytocin double-labeled neurons in the PVN and SON.

Double-labeling fluorescence immunohistochemistry showed that P2X receptor subunits are differentially expressed on vasopressin- and oxytocin-containing neurons of the SON and PVN. In the SON, oxytocin-containing neurons expressed P2X2, P2X4 and P2X5 receptors, although the P2X6 receptor was expressed in this nucleus. In the PVN, oxytocin-containing neurons expressed P2X4, although P2X2, P2X5 and P2X6 receptors were expressed in this nucleus (Burnstock, 2007; Guo et al., 2009; Song et al., 2009; Song et al., 2011). In addition, it was also demonstrated that almost all the vasopressin and oxytocin-expressing neurons in SON, PVN and accessory neurosecretory nuclei were also immunoreactive for P2Y receptors (Burnstock, 2007; Guo et al., 2009; Song et al., 2009; Song et al., 2011).

In conclusion, the present study demonstrates that non-selective P2 purinergic receptor antagonists were able to reduce the activity of

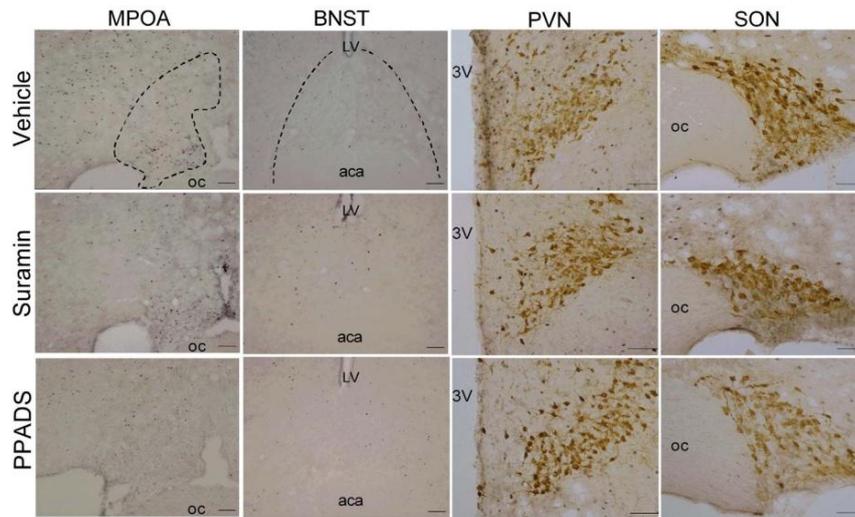


Fig. 3. Representative photomicrographs showing immunoreactivity for c-Fos in the medial preoptic area (MPOA) and in bed nucleus of stria terminalis (BNST), and oxytocin neurons and c-Fos/oxytocin in the paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON) of lactating rats treated with vehicle (5 µL, i.c.v.), suramin (37.5 µg/5 µL, i.c.v.) or PPADS (37.5 µg/5 µL, i.c.v.). Scale bar: 100 µm. aca: anterior commissure; LV: lateral ventricle; 3V: third cerebral ventricle; oc: optic chiasm.

oxytocinergic neurons and neurons of important areas for the initiation and maintenance of maternal behavior. This reduction in neuronal activity by antagonists was accompanied simultaneously by disruption of maternal behavior after maternal separation, suggesting for the first time that endogenous nucleotides of purines and pyrimidines, acting on P2 purinoceptors, modulate the behavioral responses of lactating rats.

Acknowledgments

We would like to thank José Reis for his technical assistance. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; #APQ-0041-15), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; #300977/2013-1) and Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES; PNPD and Pró-equipamentos; #23038006962201110).

References

- Bjelobaba, I., Janjic, M.M., Stojilkovic, S.S., 2015. Purinergic signaling pathways in endocrine system. *Auton. Neurosci.* 191, 102–116.
- Bosch, O.J., Pförtsch, J., Beiderbeck, D.I., Landgraf, R., Neumann, I.D., 2010. Maternal behaviour is associated with vasopressin release in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *J. Neuroendocrinol.* 22, 420–429.
- Bridges, R.S., 2015. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Front. Neuroendocrinol.* 36, 178–196.
- Burnstock, G., 1986. Purines and cotransmitters in adrenergic and cholinergic neurones. *Prog. Brain Res.* 68, 193–203.
- Burnstock, G., 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87, 659–797.
- Burnstock, G., 2015. Physiopathological roles of P2X receptors in the central nervous system. *Curr. Med. Chem.* 22, 819–844.
- Burnstock, G., 2016. Purinergic mechanisms and pain. *Adv. Pharmacol.* 75, 91–137.
- Burnstock, G., Krügel, U., Abbracchio, M.P., Illes, P., 2011. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog. Neurobiol.* 95, 229–274.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1998. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5335–5340.
- Champagne, F.A., Francis, D.D., Mar, A., Meaney, M.J., 2003. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol. Behav.* 79, 359–371.
- Chen, Z.P., Levy, A., Lightman, S.L., 1994. Activation of specific ATP receptors induces a rapid increase in intracellular calcium ions in rat hypothalamic neurons. *Brain Res.*

641, 249–256.

- Cisneros-Mejorado, A., Pérez-Samartín, A., Gottlieb, M., Matute, C., 2015. ATP signaling in brain: release, excitotoxicity and potential therapeutic targets. *Cell. Mol. Neurobiol.* 35, 1–6.
- Cunha, R.A., 2016. How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? *J. Neurochem.* 139, 1019–1055.
- Cunha, R.A., Vizi, E.S., Ribeiro, J.A., Sebastião, A.M., 1996. Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* 67, 2180–2187.
- Custer, E.E., Knott, T.K., Cuadra, A.E., Ortiz-Miranda, S., Lemos, J.R., 2012. P2X purinergic receptor knockout mice reveal endogenous ATP modulation of both vasopressin and oxytocin release from the intact neurohypophysis. *J. Neuroendocrinol.* 24, 674–680.
- de Faria, D.R., Santana, J.S., Menani, J.V., de Paula, P.M., 2009. Antidiuretic effects of central adenosine-5'-triphosphate. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42, 105–113.
- Febo, M., Numan, M., Ferris, C.F., 2005. Functional magnetic resonance imaging shows oxytocin activates brain regions associated with mother-pup bonding during suckling. *J. Neurosci.* 25, 11637–11644.
- Florenzano, F., Carrive, P., Viscomi, M.T., Ferrari, F., Latini, L., Conversi, D., Cabib, S., Bagni, C., Molinari, M., 2008. Cortical and subcortical distribution of ionotropic purinergic receptor subunit type 1 (P2X1R) immunoreactive neurons in the rat forebrain. *Neuroscience* 151, 791–801.
- Gimpl, G., Fahrenholz, F., 2001. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 81, 629–683.
- Gomes, D.A., Song, Z., Stevens, W., Sladek, C.D., 2009. Sustained stimulation of vasopressin and oxytocin release by ATP and phenylephrine requires recruitment of desensitization-resistant P2X purinergic receptors. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R940–R949.
- Gourine, A.V., Melenchuk, E.V., Poputnikov, D.M., Gourine, V.N., Spyer, K.M., 2002. Involvement of purinergic signalling in central mechanisms of body temperature regulation in rats. *Br. J. Pharmacol.* 135, 2047–2055.
- Guo, W., Sun, J., Xu, X., Bunstock, G., He, C., Xiang, Z., 2009. P2X receptors are differentially expressed on vasopressin- and oxytocin-containing neurons in the supraoptic and paraventricular nuclei of rat hypothalamus. *Histochem. Cell Biol.* 131, 29–41.
- Gurin, V.N., Gurin, A.V., Melenchuk, E.V., Spyer, K.M., 2002. Effect of activation and blockade of central P2X receptors on body temperature. *Russ. Fiziol. Zh. Im. I M Sechenova* 88, 731–740.
- Kapoor, J.R., Sladek, C.D., 2000. Purinergic and adrenergic agonists synergize in stimulating vasopressin and oxytocin release. *J. Neurosci.* 20, 8868–8875.
- Kittner, H., Franke, H., Fischer, W., Schultheis, N., Krügel, U., Illes, P., 2003. Stimulation of P2Y1 receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y1 receptor-mediated nitric oxide production. *Neuropsychopharmacology* 28, 435–444.
- Kittner, H., Franke, H., Harsch, J.I., El-Ashmawy, I.M., Seidel, B., Krügel, U., Illes, P., 2006. Enhanced food intake after stimulation of hypothalamic P2Y1 receptors in rats: modulation of feeding behaviour by extracellular nucleotides. *Eur. J. Neurosci.* 24, 2049–2056.

- Krueger, J.M., Taishi, P., De, A., Davis, C.J., Winters, B.D., Clinton, J., Szentirmai, E., Zielinski, M.R., 2010. ATP and the purine type 2 X7 receptor affect sleep. *J. Appl. Physiol.* 109, 1318–1327.
- Lonstein, J.S., Simmons, D.A., Swann, J.M., Stern, J.M., 1998. Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats. *Neuroscience* 82, 267–281.
- Masaki, E., Ebisawa, T., Kondo, I., Hayashida, K., Matsumoto, Y., Kawamura, M., 2000. P2-purineric receptor antagonists reduce the minimum alveolar concentration of inhaled volatile anesthetics. *Brain Res.* 864, 130–133.
- Matsushita, N., Muroi, Y., Kinoshita, K., Ishii, T., 2015. Comparison of c-Fos expression in brain regions involved in maternal behavior of virgin and lactating female mice. *Neurosci. Lett.* 590, 166–171.
- Moos, F., Poulain, D.A., Rodríguez, F., Guerné, Y., Vincent, J.D., Richard, P., 1989. Release of oxytocin within the supraoptic nucleus during the milk ejection reflex in rats. *Exp. Brain Res.* 76, 593–602.
- Mori, M., Tsushima, H., Matsuda, T., 1992. Antidiuretic effects of purinoceptor agonists injected into the hypothalamic paraventricular nucleus of water-loaded, ethanol-anesthetized rats. *Neuropharmacology* 31, 585–592.
- Neumann, I.D., 2007. Stimuli and consequences of dendritic release of oxytocin within the brain. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1252–1257.
- Numan, M., 1994. A neural circuitry analysis of maternal behavior in the rat. *Acta Paediatr. Suppl.* 397, 19–28.
- Numan, M., Stolzenberg, D.S., 2009. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 46–64.
- Olazábal, D.E., Pereira, M., Agrati, D., Ferreira, A., Fleming, A.S., González-Mariscal, G., Lévy, F., Lucion, A.B., Morrell, J.J., Numan, M., Uriarte, N., 2013. New theoretical and experimental approaches on maternal motivation in mammals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37, 1860–1874.
- Ong, W.Y., Motin, L.G., Hansen, M.A., Dias, L.S., Ayrout, C., Bennett, M.R., Balcar, V.J., 1997. P2 purinoceptor blocker suramin antagonises NMDA receptors and protects against excitatory behaviour caused by NMDA receptor agonist (RS)-(tetrazol-5-yl)-glycine in rats. *J. Neurosci. Res.* 49, 627–638.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Pedersen, C.A., Boccia, M.L., 2003 Nov. Oxytocin antagonism alters rat dams' oral grooming and upright posturing over pups. *Physiol. Behav.* 80 (2–3), 233–241.
- Pereira, M., Farrar, A.M., Hockemeyer, J., Müller, C.E., Salamone, J.D., Morrell, J.J., 2011. Effect of the adenosine A2A receptor antagonist MSX-3 on motivational disruptions of maternal behavior induced by dopamine antagonism in the early postpartum rat. *Psychopharmacology* 213, 69–79.
- Pereira, A.S., Giusti-Paiva, A., Vilela, F.C., 2015. Central corticosterone disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. *Neurosci. Lett.* 606, 88–93.
- Perrin, G., Meurisse, M., Lévy, F., 2007. Inactivation of the medial preoptic area or the bed nucleus of the stria terminalis differentially disrupts maternal behavior in sheep. *Horm. Behav.* 52, 461–473.
- Ralevic, V., Burnstock, G., 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413–492.
- Shibuya, I., Tanaka, K., Hattori, Y., Uezono, Y., Harayama, N., Noguchi, J., Ueta, Y., Izumi, F., Yamashita, H., 1999. Evidence that multiple P2X purinoceptors are functionally expressed in rat supraoptic neurones. *J. Physiol.* 514, 351–367.
- Song, Z., Vijayaraghavan, S., Sladek, C.D., 2007. ATP increases intracellular calcium in supraoptic neurons by activation of both P2X and P2Y purineric receptors. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 292, R423–R431.
- Song, Z., Gomes, D.A., Stevens, W., 2009. Role of purineric P2Y1 receptors in regulation of vasopressin and oxytocin secretion. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 297, R478–R484.
- Song, X., Guo, W., Yu, Q., Liu, X., Xiang, Z., He, C., Burnstock, G., 2011. Regional expression of P2Y(4) receptors in the rat central nervous system. *Purineric Signal* 7, 469–488.
- Troadee, J.D., Thirion, S., Nicaise, G., Lemos, J.R., Dayanithi, G., 1998. ATP-evoked increases in [Ca²⁺]_i and peptide release from rat isolated neurohypophysial terminals via a P2X2 purinoceptor. *J. Physiol.* 511, 89–103.
- Vilela, F.C., Giusti-Paiva, A., 2011. Glucocorticoids disrupt neuroendocrine and behavioral responses during lactation. *Endocrinology* 152, 4838–4845.
- Vilela, F.C., Giusti-Paiva, A., 2014 Apr 15. Cannabinoid receptor agonist disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. *Behav. Brain Res.* 263, 190–197.
- Vilela, F.C., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L., Giusti-Paiva, A., 2013. Corticosterone synthesis inhibitor metyrapone preserves changes in maternal behavior and neuroendocrine responses during immunological challenge in lactating rats. *Neuroendocrinology* 97, 322–330.
- Wu, Y., Willcockson, H.H., Maixner, W., Light, A.R., 2004. Suramin inhibits spinal cord microglia activation and long-term hyperalgesia induced by formalin injection. *J. Pain* 5, 48–55.
- Xiang, Z., Bo, X., Oglesby, I., Ford, A., Burnstock, G., 1998. Localization of ATP-gated P2X2 receptor immunoreactivity in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 813, 390–397.
- Xiang, Z., He, C., Burnstock, G., 2006. P2X5 receptors are expressed on neurons containing arginine vasopressin and nitric oxide synthase in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 1099, 56–63.
- Zou, C.J., Onaka, T.O., Yagi, K., 1998. Effects of suramin on neuroendocrine and behavioural responses to conditioned fear stimuli. *Neuroreport* 9, 997–999.