

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**



Roberta Oriques Becker

**A ocitocina modula a densidade e a
morfologia dos espinhos dendríticos
na amígdala medial póstero-dorsal de
camundongos**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2017**

Roberta Oriques Becker

A ocitocina modula a densidade e a morfologia dos espinhos dendríticos na amígdala medial pósterodorsal de camundongos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Márcia Giovenardi.
Coorientador: Alberto Antônio Rasia Filho.

**Porto Alegre
2017**

Roberta Oriques Becker

A ocitocina modula a densidade e a morfologia dos espinhos dendríticos na amígdala medial pósterio-dorsal de camundongos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Porto Alegre, 23 de novembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Profª Dra. Renata Padilha Guedes

Profª Dra. Lenir Orlandi Pereira Silva

Profª Dra. Maria Elisa Calcagnotto

Prof. Dr. Luciano Sturmer de Fraga

Catálogo na Publicação

Oriques Becker, Roberta

A ocitocina modula a densidade e a morfologia dos espinhos dendríticos na amígdala medial pósterodorsal de camundongos / Roberta Oriques Becker. -- 2017.

70 p. : il., graf. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

Orientador(a): Márcia Giovenardi ; coorientador(a): Alberto Antônio Rasia Filho.

1. Amígdala medial pósterodorsal. 2. Morfologia dos espinhos dendríticos. 3. Densidade de espinhos dendríticos. 4. Comportamento sexual. 5. Plasticidade neural. I. Título.

Dedico este trabalho a minha querida mãe Marilva Oriques Becker (*in memoriam*), que dedicou sua vida às realizações pessoais e profissionais de seus filhos. Amor eterno!

*“... and now, as you graduate to begin
anew, I wish that for you. Stay Hungry.*

Stay Foolish”.

Steve Jobs

AGRADECIMENTOS

À CAPES, à UFCSPA e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade.

À minha querida orientadora Prof^a Dr. Márcia Giovenardi, um exemplo de pesquisadora e professora, minha gratidão pela orientação desde a iniciação científica, pelo incentivo, pela confiança, pelos ensinamentos e pela amizade. Muito obrigada por esses dez anos de ensinamentos profissionais e pessoais! Minha admiração eterna a você!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Alberto Antônio Rasia Filho, pelo incentivo à ciência, pela confiança, pela dedicação e pelo senso de humor. Muito obrigada pela oportunidade de ter sido tua aluna!

À minha amiga Virgínia Meneghini Lazzari, pela parceria na ciência e na vida.

À minha amiga Itiana de Castro Menezes, pelo carinho, pelo conversas, pelas risadas e, principalmente, pela ajuda na realização dos experimentos.

Às técnicas do laboratório de fisiologia Carmem Lúcia Andrades e Alexandra Guimarães pela ajuda na preparação dos materiais para realização dos experimentos e pelo incentivo constante.

Aos meus amigos da UFCSPA e da UNICNEC por tomarem meus dias mais alegres e por compartilharem comigo essa jornada.

Ao meu pai Osvaldo, ao meu irmão Ronaldo, à minha irmã Renata, ao meu cunhado Elton, às minhas sobrinhas Íris e Bianca, à minha cachorrinha Tita e ao meu namorado Gustavo, pelo apoio e pelo amor. Obrigada por entenderem minhas ausências e apoiarem meus sonhos!

RESUMO

A ocitocina (OT) atua como um neurotransmissor/neuromodulador para regular um grande variedade de funções do sistema nervoso central (SNC) em machos e fêmeas, incluindo os comportamentos parentais, afiliativos e sexuais, bem como a memória social. A amígdala medial pósterio-dorsal (MePD) é uma área sexualmente dimórfica localizada rede neural dos comportamento sociais, que apresenta alta concentração de receptores de OT. No nível celular, os espinhos dendríticos apresentam morfologias diversas, que vão desde pequenas protusões até formas maiores, e são considerados elementos pós-sinápticos com propriedades essenciais para o processamento das informações. Os espinhos dendríticos localizados nessa estrutura apresentam elevada plasticidade e são afetados por estímulos sociais dependentes do contexto. Neste trabalho, avaliamos os efeitos da deleção seletiva do gene da OT (OTKO) na quantidade e na morfologia dos espinhos dendríticos impregnados pela técnica de Golgi na MePD de camundongos (n = 6 em cada grupo) fêmeas (em diestro e proestro) e machos (com e sem experiência sexual). Para cada animal, foram analisados 8 dendritos diferentes com 1 dendrito por neurônios amostrado. As 3 principais morfologias de espinhos dendríticos encontradas na MePD foram identificadas e contadas a partir dessas amostras. Ou seja, as características morfológicas da cabeça e do pescoço dos espinhos permitiram a sua classificação em fino, cogumelo e achatado. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na densidade de espinhos dendríticos entre as fêmeas em diestro. Contudo, no proestro, as fêmeas OTKO apresentam uma maior quantidade de espinhos dendríticos do que as fêmeas controle (WT), sendo que esse dado está relacionado com os espinhos dendríticos de diferentes morfologias. Os espinhos do tipo fino representam a metade de todas as morfologias observadas em ambos os grupos, mas o número de espinhos do tipo fino, cogumelo e achatado foi consideravelmente maior nos dendritos proximais dos camundongos fêmeas OTKO do que nas fêmeas WT. Notavelmente, esses dados também indicam que a morfologia cogumelo apresentou os efeitos mais intensos da deleção seletiva do gene da OT e das alterações na transmissão ocitocinérgica para a MePD e/ou dentro da MePD. Nos machos, em comparação com WT/ virgem, o grupo OTKO/virgem não apresentou diferenças na densidade de espinhos dendríticos,

mas ocorreu uma redução significativa na quantidade de espinhos dendríticos no grupo WT/Com experiência sexual (SexExp) quando comparado ao grupo OTKO/SexExp. Essa mudança estrutural está relacionada com morfologias específicas de espinhos dendríticos. Ou seja, a experiência sexual induziu uma diminuição no número de espinhos do tipo fino e cogumelo, ao mesmo tempo, um aumento no número de espinhos do tipo achatado. Além disso, os animais OTKO/SexExp apresentam mais espinhos do tipo fino e do tipo cogumelo do que o grupo WT/SexExp. Nossos resultados aumentam a notoriedade da participação da OT no remodelamento dos espinhos dendríticos, no refinamento sináptico e na plasticidade dependente de estímulos sociais na MePD, com implicações funcionais na regulação dos aspectos reprodutivos em camundongos fêmeas e machos.

Palavras-chave: Amígdala medial póstero-dorsal, morfologia dos espinhos dendríticos, densidade de espinhos dendríticos, comportamento sexual, plasticidade neural.

ABSTRACT

Oxytocin (OT) acts as a neurotransmitter/neuromodulator to regulate a diverse range of central nervous system (CNS) functions in both males and females, including parental, affiliative, and sexual behaviors, as well as social memory. The posterodorsal medial amygdala (MePD) is a sexually dimorphic area in the social behavior neural network, with high concentration of OT receptors. At the cellular level, dendritic spines have shapes ranging from small protrusions to large forms and are considered postsynaptic elements with critical properties for the information processing. Local dendritic spines are notably plastic and affected by context-dependent social stimuli. Here, we examined the effects of the selective deletion of the OT gene (OTKO) in the number and shape of Golgi-impregnated dendritic spines in the MePD of females (in proestrus and diestrus phases) and males (naïve and sexually experienced) mice (n=6 each group). For each mice, 8 different dendrites were studied with 1 dendrite per sampled neuron. The 3 main differently shaped spines found in the MePD were identified and counted from these samples. That is, the morphological features of the spine head and neck allowed spine classification as thin, mushroom or stubby/wide. There was no statistically significant difference in the dendritic spine density between diestrus females. On the other hand, OTKO females in proestrus have a higher number of proximal dendritic spines than control (WT) mice and the spine density increase in OTKO mice involves differently shaped spines. Thin spines represent half of all observed shapes in both groups, but the number of thin, mushroom, and stubby/wide spines was consistently higher in proximal dendrites of OTKO mice than in WT females. Notably, these data also indicate that mushroom spines were the type that showed more intense effects following the selective deletion of the OT gene and the altered oxytocinergic transmission to and/or within the MePD. In males, compared to the WT/naïve group, OTKO/naïve group did not differ in the density of dendritic spines, but there was a significant and more intense reduction in the number of spines in the WT/sexually experienced (SexExp) than in the OTKO/SexExp groups. This structural change had a spine-specific feature. That is, sexual experience induced a decrease in the number of thin and mushroom-like spines at the same time that increased the number of stubby/wide spines. In addition, the OTKO/SexExp animals have more

thin and mushroom spines than the WT/SexExp ones. Our results add to the notion that OT participates in the spine remodeling, synaptic refinement, and social stimuli-dependent plasticity in the MePD with functional implications on the reproductive regulation of female and male mice.

Keywords: Posterodorsal medial amygdala, spine structure, dendritic spine density, reproductive behavior, neural plasticity.

LISTA DE ABREVIATURAS DA REVISÃO DA LITERATURA

AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AOB	Bulbo olfatório acessório
AVP	Vasopressina
BST	Núcleo do leito da estria terminal
BSTma	Subdivisão ântero-medial do núcleo do leito da estria terminal
CoA	Núcleo cortical da amígdala
D _h	Diâmetro da cabeça
D _n	Diâmetro do pescoço
E2	Estrógeno
FSH	Hormônio folículo estimulante
GC	Células granulares
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
L	Comprimento
LH	Hormônio luteinizante
LTP	Potencialização de longo prazo
MC	Células Mitrals
MeA	Amígdala medial
MeAD	Amígdala medial ântero-dorsal
MeAV	Amígdala medial ântero-ventral
MePD	Amígdala medial pósterodorsal
MePV	Amígdala medial póstero-ventral
MOB	Bulbo olfatório principal
MPOA	Área pré-óptica medial
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
OB	Bulbo olfatório
Opt	Trato óptico
OT	Ocitocina
OTR	Receptor da ocitocina
OTKO	Camundongos nocaute para o gene da ocitocina
P4	Progesterona
PRL	Prolactina
PSD	Densidade pós-sináptica

PVN	Núcleo hipotalâmico paraventricular
RNA	Ácido ribonucleico
SNC	Sistema nervoso central
SON	Núcleo hipotalâmico supraóptico
St	Estria terminal
VMH	Hipotálamo ventromedial
VMHvl	Porção ventrolateral do hipotálamo ventromedial
VNO	Órgão vomeronasal
WT	Camundongos selvagens

SUMÁRIO

1.	REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1	Introdução	14
1.2	Ocitocina	14
1.3	Comportamento Sexual	17
1.4	Ocitocina e a Neuromodulação dos Circuitos Envolvidos no Comportamento Sexual	19
1.4.1	Bulbo Olfatório	20
1.4.2	Amígdala Medial	21
1.4.3	Hipotálamo	24
1.5	Técnica de Golgi e Caracterização dos Neurônios da Amígdala Medial Póster-Dorsal.....	26
1.6	Plasticidade Sináptica e Espinhos Dendríticos	27
2.	JUSTIFICATIVA	31
3.	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo Geral	32
3.2	Objetivos Específicos.....	32
4.	ARTIGOS	33
4.1	Artigo 1: Differently shaped spines increase in the posterodorsal medial amygdala of oxytocin knockout female mice.	33
4.1.1.	Resultados Adicionais: Análise da densidade e da morfologia de espinhos dendríticos na amígdala medial póster-dorsal de fêmeas na fase do diestro que eram nocaute para o gene da ocitocina.....	38
4.2	Artigo 2: Selective deletion of the oxytocin gene remodels the number and shape of dendritic spines in the medial amygdala of males with and without sexual experience	44
5.	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
7.	ANEXO 1: PARECERES DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	63

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Introdução

O comportamento é uma das principais interfaces entre um animal e seu ambiente. Ao longo da evolução, os mecanismos cognitivos e neurais foram moldados para encontrar soluções adaptativas e garantir a sobrevivência das espécies (1,2). As respostas comportamentais que estão relacionadas com o desenvolvimento e a manutenção dos vínculos sociais são conhecidas como comportamentos sociais. Como são essenciais para a reprodução, os mecanismos neurais e hormonais que modulam os comportamentos sociais são altamente conservados, o que permite a manutenção das habilidades essenciais para a vida em grupo (3–5).

Nos mamíferos, os grupos sociais são caracterizados por altos níveis de complexidade no tipo e na quantidade de interações sociais entre os membros do grupo, o que permite o surgimento de uma hierarquia social (4). Nas interações entre machos e fêmeas, os comportamentos são geralmente de origem afiliativa, como na formação de pares e no comportamento sexual. Entre machos, as repostas comportamentais frequentemente são agressivas e vinculadas à competição por fêmeas (6,7). As diferenças entre espécies ou entre indivíduos de uma mesma espécie refletem as influências neuromodulatórias no desenvolvimento e na função dos circuitos neurais que medeiam os comportamentos sociais (8).

A plasticidade dos circuitos neurais, em resposta a estímulos sensoriais e interações ambientais, está diretamente relacionada com a secreção de diversos neuromoduladores (9–13). Um neuromodulador em particular, o hormônio peptídico ocitocina (OT), tem sido relacionado aos comportamentos sociais afiliativos, parentais e copulatórios (14–16).

1.2 Ocitocina

Os neuropeptídeos são definidos como sequências biologicamente ativas, compostas por três ou mais resíduos de aminoácidos, que são produzidos e

liberados por diferentes populações de neurônios e são capazes de influenciar parâmetros funcionais em neurônios alvo através da interação com receptores acoplados a proteína G (17). Os neuropeptídeos OT e vasopressina (AVP) são sintetizados como moléculas precursoras nos corpos celulares dos neurônios magnocelulares que estão agrupados principalmente em duas estruturas hipotalâmicas, o núcleo supraóptico (SON), que se situa nas bordas laterais do quiasma óptico e o núcleo paraventricular (PVN), localizado no hipotálamo, adjacente ao terceiro ventrículo. Os potenciais de ação nessas células neurosecretoras desencadeiam a liberação de OT e AVP de seus terminais axonais na neurohipófise, formando o sistema hipotálamo-neurohipofiseal (18–22). Durante o transporte axonal das vesículas secretórias ocorre o processamento pós-traducional, que produz os peptídeos biologicamente ativos OT e AVP, bem como suas proteínas carreadoras, as neurofisinas. A partir da neurohipófise, a OT atinge a circulação sistêmica e atua nos órgãos-alvo, promovendo a contração das células mioepiteliais que envolvem os alvéolos e ductos das glândulas mamárias e o músculo liso do endométrio, naquele estimulando a ejeção do leite e neste as contrações rítmicas do útero, que são responsáveis pela expulsão do feto (7,23–25).

A OT também é produzida, em menores quantidades, na zona parvocelular do PVN. Os neurônios desta divisão projetam-se para outras áreas do SNC, tais como: núcleo dorsomedial do hipotálamo, núcleos talâmicos, hipocampo dorsal e ventral, córtex entorrinal, área medial e lateral do núcleo septal, amígdala, bulbo olfatório (OB), substância negra, locus coeruleus, núcleos da rafe, núcleo do trato solitário e núcleo motor dorsal do nervo vago. Apenas 0,2% dos neurônios ocitocinérgicos enviam concomitantemente projeções para a neurohipófise e para outras áreas do SNC. A OT que é sintetizada pelos neurônios parvocelulares do PVN, pode ainda, ser liberada diretamente no líquido por dendritos localizados na parede do terceiro ventrículo (21,22,26). A liberação central de OT tem sido associada a efeitos sociais (10,27,28), incluindo os comportamentos sociais que dependem de olfação na maioria das espécies, como o comportamento sexual (29–32), o maternal (9,33,34) e o agressivo maternal (35). Além disso, pode ser liberada durante a escolha e a formação de pares sexuais e, esse peptídeo associado à AVP, pode agir também influenciando comportamentos relacionados ao estresse, ao aprendizado e à memória (36,37).

A plasticidade dos neurônios ocitocinérgicos pode ser alterada dependendo da demanda fisiológica destas células. Isto ocorre, por exemplo, durante a desidratação, a lactação e o parto (22). Nesses casos os neurônios magnocelulares hipertrofiam e ocorre aumento das sinapses glutamatérgicas e GABAérgicas, bem como a diminuição da quantidade e do tamanho dos prolongamentos astrocíticos na região (38). Já os neurônios do SON apresentam alterações morfológicas de acordo com a atividade desempenhada. Por exemplo, em fêmeas lactantes, o corpo celular, os dendritos e os contatos sinápticos dos neurônios ocitocinérgicos aumentam, o que ocasiona modificações na arborização dendrítica em comparação com as fêmeas virgens (39,40).

O receptor da ocitocina (OTR) pertence à família dos receptores heterotriméricos acoplados à proteína G, sendo expresso por diversos tipos de células, incluindo neurônios, osteoclastos, mioblastos, células endoteliais, adipócitos e vários tipos de células cancerígenas (22,41). As diferentes expressões do OTR no encéfalo podem explicar as variações comportamentais observadas em diferentes espécies. Diferentes vias de transdução de sinais regulam a expressão do OTR e o *binding* em cada região cerebral e podem, em parte, mediar a habilidade da OT para exercer diversos efeitos comportamentais (42). Os OTRs estão localizados ao longo dos axônios, nos terminais pré e pós-sinápticos de sinapses excitatórias e inibitórias e nas células da glia (43). Em roedores, a distribuição do OTR ocorre principalmente no OB, no tubérculo olfatório, no neocórtex, nos núcleos basais, no córtex piriforme, no córtex insular e perirrinal, na formação hipocampal, na amígdala central, no núcleo do leito da estria terminal (BST), no septo lateral, no núcleo accumbens, no hipotálamo ventromedial (VMH), no núcleo do trato solitário, na área tegmentar ventral, no complexo mamilar, na oliva dorsal, no núcleo espinal trigeminal, no tronco encefálico e na medula espinhal (44–46).

A maior parte do conhecimento sobre os efeitos centrais da OT estão relacionados aos estudos farmacológicos com agonistas e antagonistas da OT (47–49). O conhecimento acerca dos efeitos da OT tem sido ampliado devido aos estudos utilizando camundongos nocaute para o gene da OT (OTKO). Atualmente existem diversas metodologias para a interrupção do funcionamento do sistema ocitocinérgico (12). Os primeiros camundongos foram desenvolvidos pelos seguintes grupos: Nishimori et al. (1996) realizaram a deleção do primeiro éxon do gene da OT através da recombinação homóloga em células tronco embrionárias;

Young et al. (1995) deletaram um segmento do segundo éxon para eliminar a neurofisina. Nesses animais não ocorrem alterações significativas em relação ao parto, mas os animais OTKO apresentam um déficit na lactação, devido à ausência do reflexo da ejeção do leite (33). No que se refere ao comportamento sexual, machos OTKO não apresentam alterações comportamentais e fêmeas OTKO apresentam comportamento sexual diminuído (51,52). Notavelmente, os animais OTKO são incapazes de reconhecer entre indivíduos conhecidos e desconhecidos em testes de habituação-desabituação, mas a administração central de OT no núcleo medial da amígdala (MeA) apresenta a capacidade de restaurar esse reconhecimento social (53–55). Neste contexto, os machos OTKO apresentam uma frequência aumentada nos comportamentos de investigação social em comparação com os camundongos do tipo selvagem (WT) (52). Os camundongos OTKO parecem processar a informação sensorial recrutando vias neurais alternativas, uma vez apresentaram redução da atividade na MeA, no BST e na área pré-óptica medial (MPOA) e aumento da atividade no córtex somatossensorial e no hipocampo (CA1 e CA2) após uma exposição social (53,56).

1.3 Comportamento Sexual

Os comportamentos sociais em roedores estão frequentemente associados à reprodução, como o comportamento agressivo para a manutenção de um território, a formação dos pares sexuais e o acasalamento (57). Todos esses comportamentos são sexualmente dimórficos, mas a diferenciação através do comportamento de cópula é a melhor forma de caracterizar o comportamento sexual dos roedores. Isso se deve provavelmente a vários fatores, incluindo a estereotipia, a estabilidade e a possibilidade de quantificar esse comportamento (57,58). Além disso, estudos indicam que o comportamento sexual em fêmeas e machos pode estar relacionado com diferentes sistemas anatômicos e neuroquímicos (59).

O comportamento sexual das fêmeas varia de acordo com a fase do ciclo estral, sendo que a receptividade sexual ocorre predominantemente na noite do proestro. O ciclo estral dos roedores é composto por quatro fases (proestro, estro, metaestro ou diestro I e diestro II), que exibem variações nas concentrações hormonais de estrógeno (E4), progesterona (P4), prolactina (PRL), folículo

estimulante (FSH) e luteinizante (LH) (60). Cada uma dessas fases é distinguível pela preponderância de tipos celulares característicos presentes no muco vaginal, que são: as células queratinizadas no estro, os leucócitos no diestro, as células epiteliais no proestro e uma mescla dos três tipos celulares no metaestro (61).

Em ratas, a receptividade sexual inclui componentes proceptivos, como a investigação dos genitais do macho, pequenas corridas e pulos dentro da caixa, vocalizações, exposição de partes do corpo e contatos físicos efêmeros (62). Nesses animais, o componente mais importante do comportamento sexual é a postura de receptividade assumida pela fêmea no momento da cópula, denominada reflexo de lordose. Esta postura é caracterizada pela flexão dorsal da coluna vertebral em resposta à monta realizada pelo macho, auxiliando na intromissão peniana. Na ausência de lordose a intromissão e a ejaculação não serão possíveis, demonstrando a importância deste comportamento para o sucesso reprodutivo (63,64). Em camundongos, as fêmeas receptivas realizam lordose quando montadas pelo macho, mas nesse momento a dorsiflexão pode não ser facilmente visualizada (57).

Os ratos machos geralmente iniciam um encontro sexual investigando a face e a região anogenital da fêmea (65). O padrão motor básico das montas e intromissões depende do estímulo sensorial cutâneo de forma semelhante ao que ocorre com a postura de lordose das fêmeas. A diferença é que os receptores cutâneos envolvidos estão localizados dorsalmente nas fêmeas e ventralmente nos machos (66). A ejaculação ocorre após uma série de montas e intromissões, sendo seguida pelo período refratário ou pós-ejaculatório (67). Quando machos com experiência sexual aproximam-se de fêmeas sexualmente receptivas, a cópula, normalmente, irá ocorrer segundos após o contato físico inicial (66). Além disso, a experiência sexual prévia confere a atividade copulatória uma maior “eficiência” e resistência aos efeitos decorrentes de lesões, castração e estresse (65).

A experiência sexual promove alterações fisiológicas que aumentam a resistência dos animais a tratamentos que poderiam alterar o comportamento sexual (30). Por exemplo, comparados com machos virgens, os machos com experiência sexual apresentam aumento dos testículos e da secreção das glândulas sexuais acessórias (68). Em roedores, a experiência sexual reduz os efeitos da anosmia (69), da castração (70) e da idade (71). Adicionalmente, quando uma fêmea receptiva é introduzida no ambiente, os machos com experiência sexual apresentam

uma curta latência para o início do comportamento sexual, o que não ocorre com os machos virgens (30). Ocorre ainda ativação dos sistemas de recompensa dos opióides endógenos e sensibilização dos sistemas mesolímbicos associados à motivação (72).

1.4 Ocitocina e a Neuromodulação dos Circuitos Envolvidos no Comportamento Sexual

As pistas olfatórias são processadas pelo sistema olfatório principal e pelo sistema olfatório acessório, que são especializados na detecção de odores voláteis e não voláteis respectivamente. Os comportamentos sociais refletem a integração da informação sensorial dessas duas vias na MeA, seguida pela transmissão dessa informação para o hipotálamo e para o prosencéfalo basal (57,73). As projeções da MeA, diretamente ou através do BST, para o hipotálamo são essenciais para a atividade copulatória em machos e fêmeas (Figura 1; 75,76).

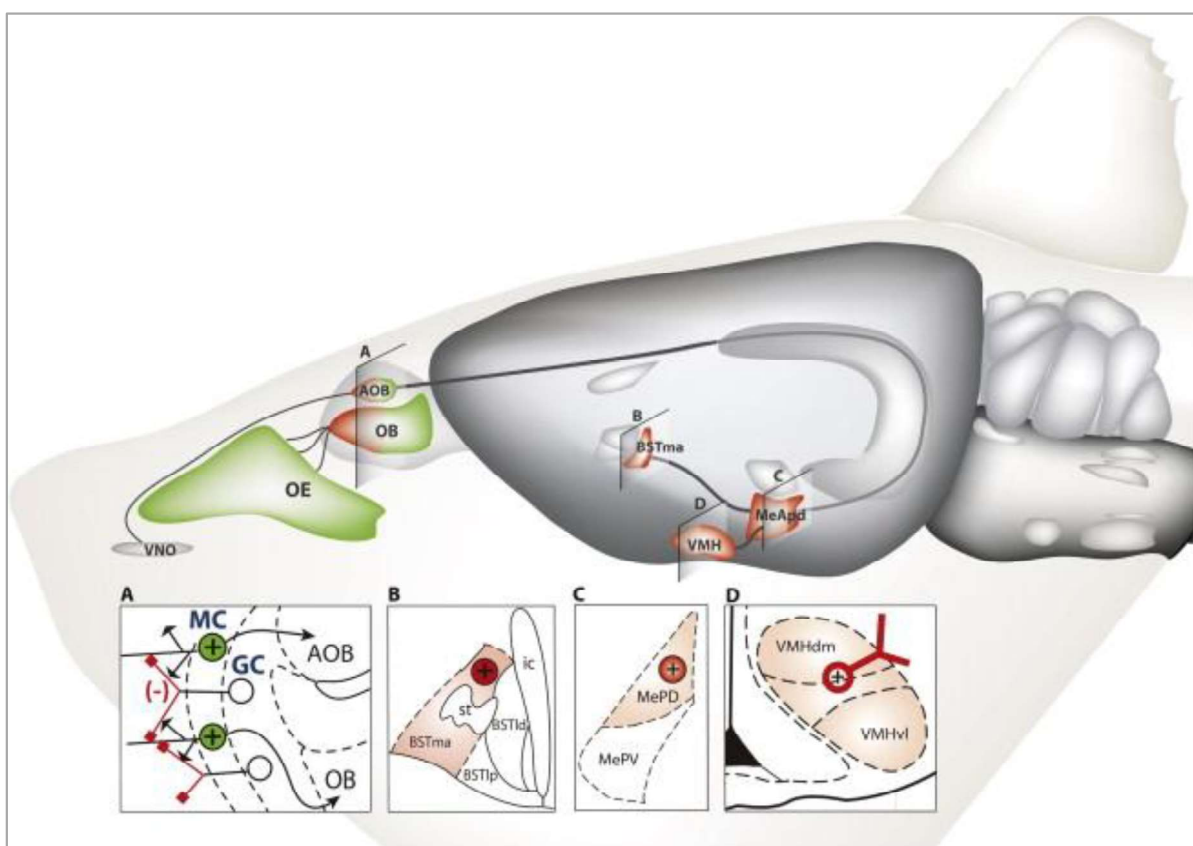


FIGURA 1. Neuromodulação dos Circuitos Envolvidos na Sinalização Social pela AVP e OT. Regiões expressando o OTR (em vermelho) e o receptor de AVP (em verde) no encéfalo de roedores e suas respectivas conexões envolvidas na

transmissão do estímulo olfatório e feromonal para regiões cerebrais relevantes para a sinalização social. Os painéis sombreados indicam os locais onde os cortes mostrados abaixo foram feitos. (A) OB mostrando as células mitrais (MC) com os corpos celulares excitados pela AVP e as células granulares (GC) com os corpos celulares inibidos pela OT. Os dendritos das MCs fazem contatos sinápticos excitatórios (setas) e recebem em troca contatos sinápticos inibitórios (quadrados) das GCs. (B) A subdivisão ântero-medial do BST (BSTma) expressando o OTR em seus corpos celulares excitados pela OT. (C) A amígdala medial pósterodorsal (MePD) expressando o OTR em seus corpos celulares excitados pela OT. (D) O VMH expressando o OTR em dendritos excitados pela OT. **Adaptado de:** <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627312008604>

1.4.1 Bulbo Olfatório

O sistema olfatório dos roedores pode ser dividido em duas vias funcionalmente distintas: o sistema olfatório principal, que é composto pelo epitélio olfatório e pelo bulbo olfatório principal (MOB); o sistema olfatório acessório, que inclui o órgão vomeronasal (VNO) e bulbo olfatório acessório (AOB). O sistema olfatório principal está relacionado com a detecção de odores voláteis, como aqueles relacionados a alimentos, predadores e parceiros sexuais. Enquanto isso, o sistema olfatório acessório é utilizado para detectar odores não voláteis que influenciam os comportamentos agressivos e sexuais, assim como o reconhecimento de coespecíficos (57). A entrada quimiossensorial em ambos os sistemas, constitui o estímulo mais importante para a ocorrência do comportamento sexual em machos. A remoção dessas vias promove a diminuição das ereções, efeitos que são observados com maior frequência em machos sem experiência sexual (65). Em hamsters machos sexualmente inexperientes, a remoção do VNO produziu uma redução no comportamento copulatório, mas este efeito foi eliminado após a exposição aos odores de fêmeas receptivas (66).

O VNO e o AOB são estruturalmente maiores nos machos do que em fêmeas. Além disso, a ativação do sistema olfatório principal, em resposta a odores voláteis, também é sexualmente dimórfica (57). Esses odores voláteis produzidos e liberados pelos machos parecem facilitar a ocorrência de lordoses em fêmeas, mas não apresentam grande influência no comportamento copulatório de machos, sendo mais importantes para a abordagem inicial (66). Os feromônios são detectados pelo VNO, que se projeta para o AOB e depois para o MeA e para o núcleo cortical da amígdala (CoA) (76). O AOB, o MeA e o CoA são particularmente ricos em OTRs e

são, portanto, locais candidatos para a ação OT na formação da memória social em camundongos (77). Embora o bulbo olfatório (OB) não possua terminais ocitocinérgicos, ele apresenta o OTR em abundância. Esse desajuste da relação entre terminais e receptores está funcionalmente relacionado com a liberação neurohumoral de OT no fluido cerebrospinal, em situações como o parto e o acasalamento (78). Esses eventos biológicos produzem mudanças significativas na sensibilidade, eficácia sináptica e ativação neural no OB, os quais fazem parte do processo de aprendizagem olfativa para a familiaridade social (79,80). Os dendritos das células mitrales (MC) do OB fazem contatos sinápticos excitatórios com as células granulares (GC) e, em troca, recebem contatos sinápticos inibitórios dos dendritos dessas células. Esse circuito de reciprocidade desempenha um importante papel no refinamento da sinalização olfatória e feromonal, sendo o papel da AVP aumentar a excitação e o da OT diminuir a inibição dos componentes dessa circuitaria (13,81).

1.4.2 Amígdala Medial

A amígdala, ou complexo amigdaliano, é uma estrutura que compreende os subnúcleos situados no lobo temporal, lateral ao hipotálamo e ventral ao estriado, no prosencéfalo basal de mamíferos (82). Em ratos, localiza-se anteriormente ao hipocampo ventral, sendo constituída por núcleos e subnúcleos que formam uma complexa rede estrutural interrelacionada e multifuncional, que está envolvida na modulação de diversos comportamentos e ajustes vegetativos (82–84). Estudos mais recentes sobre a divisão da amígdala de ratos apresentam-na dividida em quatro regiões, segundo a citoarquitetura, a hodologia e a função, que são: a amígdala “expandida”, denominada assim por se estender além de seus limites anatômicos, sendo formada pela MeA e pela amígdala central; a amígdala com características corticais, subdividida em porção basolateral e em porções que se ligam às vias olfativas principal e acessória; a área de transição, localizada entre a porção ventral dos núcleos da base e a amígdala “expandida”; os núcleos ainda não classificados, constituídos por um grande número de células dispersas na substância branca e no interior do BST (82,84).

A MeA é um dos subnúcleos superficiais do complexo amigdalóide, ocupando seu aspecto rostromedial, sendo formada por uma coluna proeminente de células que surgem em justaposição à superfície lateral de fibras que ascendem pelo trato óptico. Inicia medialmente e posteriormente ao núcleo do trato olfativo e ao núcleo anterior da amígdala, estendendo-se caudalmente até o surgimento da porção temporal do ventrículo lateral, em posição ventral em relação à estria terminal (82). Segundo os critérios de Alheid (2003) e De Olmos et al. (2004), a MeA é dividida nos seguintes subnúcleos: ântero-dorsal (MeAD), ântero-ventral (MeAV), póstero-dorsal (MePD; Figura 2) e póstero-ventral (MePV).

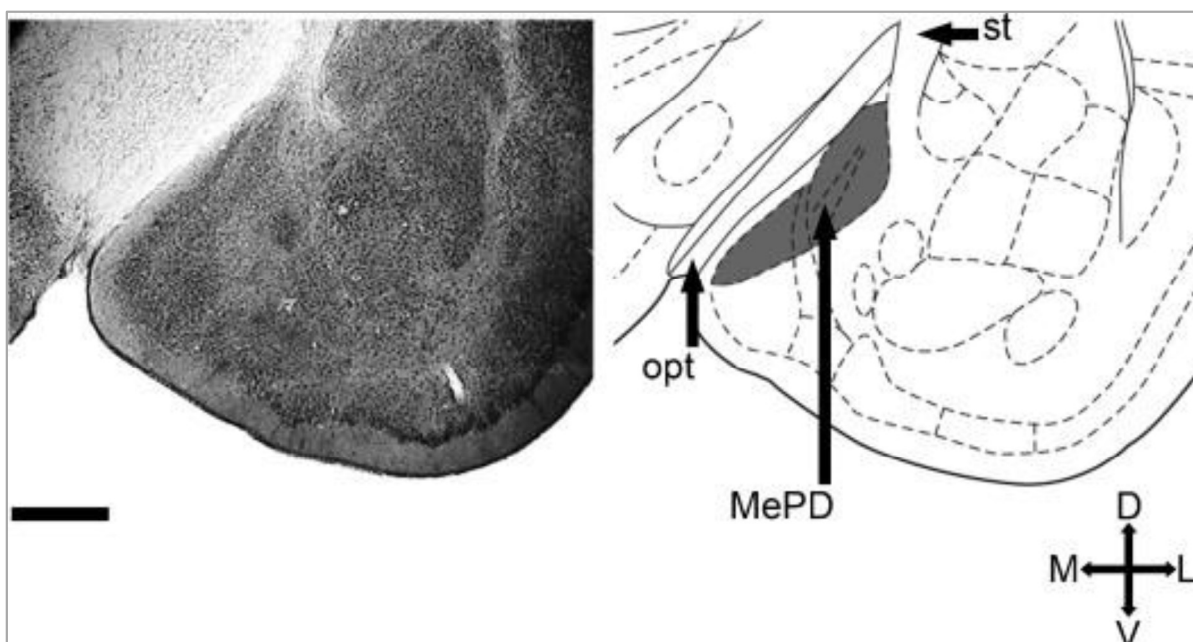


FIGURA 2. Localização da Amígdala Medial Pósterio-Dorsal (MePD). Aspecto ventrolateral de uma seção coronal do encéfalo de um rato macho com localização da MePD, do trato óptico (opt) e da estria terminal (st). Coordenadas espaciais: dorsal, lateral, medial e ventral. Barra de escala = 800 μ m. **Adaptado de:** <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394010010207?via%3Dihub#fig0005>

A MeA é uma estrutura sexualmente dimórfica que desempenha um importante papel no processamento da informação olfatória (85–87). Em ratos, aferências quimiossensoriais do OB e do VNO projetam-se para a MeA (88–90). Esse núcleo, por sua vez, processa tais informações olfativas e envia-as para áreas motoras e neuroendócrinas do telencéfalo basal, para a MPOA e outros núcleos hipotalâmicos e, também, para o tronco encefálico (88,89,91,92). Em hamsters

machos, lesões na MeA promovem uma diminuição da investigação olfatória direcionada aos genitais das fêmeas e, conseqüentemente, uma redução do comportamento sexual (93). Em fêmeas, lesões na MePD estão relacionadas com uma frequência menor da investigação olfatória e uma latência maior entre a ocorrência das cópulas (75,94). Dessa forma, lesões na MeA causam alterações significativas nos modelos de comportamento sexual, o que reforça a hipótese de que a MeA pode ser um importante componente do circuito neural que modula o comportamento copulatório de roedores. Particularmente, entre outras funções, a MePD participa da interpretação das informações olfativas/vomeronasais ou genitosensoriais (87,95) e da modulação do comportamento sexual de machos e fêmeas (85,96–98).

A MePD é separada do trato óptico por uma camada com poucos corpos celulares, a qual se torna estreita em direção rostral e dorsal até que desaparece completamente nas proximidades da MeAD. Essa região preferentemente deve ser considerada como local de passagem de axônios advindos do núcleo próprio da via olfativa acessória para transmissão de informação vomeronasal (84). As aferências mais importantes para a MePD são as corticais, as hipotalâmicas, as talâmicas, as do tronco encefálico, as olfatórias e de outras regiões distintas, como as do BST e da substância inominata. Em relação às eferências, dentre as mais significativas e estudadas, estão aquelas para o BST, a substância inominata e para três núcleos hipotalâmicos interconectados e implicados em comportamentos reprodutivos: a MPOA, núcleo pré-mamilar ventral e a porção ventrolateral do VMH (VMHvl) (91,96).

Em machos, a MePD modula principalmente os comportamentos de intromissão e ejaculação (90,99). Em fêmeas, a MePD está envolvida na regulação da secreção neuroendócrina do GnRH e da PRL (100), e ainda, na modulação dos comportamentos sociais, como o maternal e o sexual (90,101). Essa estrutura é altamente sensível à ação dos hormônios gonadais (102). O volume da MePD (103,104), a densidade neuronal (105) e glial (106), o volume neuronal (107), a orientação dendrítica (108) e os contatos sinápticos (109) são sexualmente dimórficos e/ou alteráveis ao longo do ciclo estral. Nesse sentido, a MePD promove mudanças fisiológicas na secreção neuroendócrina e no comportamento social, isso ocorre de acordo com os diferentes estímulos e demandas ambientais (85,96,98,99,110).

Estudos realizados na MeA de roedores têm demonstrado a presença de corpos celulares e fibras nervosas imunorreativas a diferentes neuropeptídeos, tais como: angiotensina II, colecistoquinina, galanina, hormônio liberador de corticotrofina, hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), neuropeptídeo Y, neurotensina, opióides, peptídeo intestinal vasoativo, peptídeo liberador de gastrina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, polipeptídeo natriurético atrial, somatostatina, substância P, serotonina, AVP e OT (13,111–116). Em várias espécies, a MeA apresenta grande concentração de OTRs (44). No entanto, o mecanismo pelo qual a OT modula a atividade dessa estrutura é desconhecido, acredita-se que, assim como ocorre em outras estruturas anatômicas, a OT modula a liberação de outros neurotransmissores (117). Por exemplo, no OB a OT facilita a liberação noradrenérgica, melhorando dessa forma o reconhecimento olfatório (118). Durante uma exposição social, os animais OTKO apresentaram uma redução na atividade da MeA e um aumento na atividade do córtex e do hipocampo. Essa ativação atípica parece não estar relacionada com a memória social, sendo, provavelmente, uma forma de compensar os déficits sofridos no circuito neural dos comportamentos sociais (53). Terenzi e Ingram (2005) demonstraram os efeitos excitatórios da OT na MePD em resposta a estímulos sensoriais relacionados ao comportamento sexual, os quais estão diretamente relacionados com a alta concentração do OTR nessa estrutura (120). Quando comparados à amígdala central, esses efeitos são maiores, mais duradouros, mais sensíveis e menos dessensibilizantes depois de repetidas aplicações. A OT produz os mesmos efeitos na BSTma, uma região homóloga a MeA que, interessantemente, poderiam ser aumentados pela ação de E2 ou P4 (13).

1.4.3 Hipotálamo

O comportamento de lordose é iniciado pela presença dos hormônios sexuais, E2 e P4, e ocorre em resposta à informação sensorial tátil, normalmente fornecida pela monta realizada pelo macho (121). Além de depender da ação dos hormônios esteróides gonadais, o reflexo de lordose é resultante da ativação de uma circuitaria neural e, por este motivo, muitas estruturas estão envolvidas na realização desse reflexo. A indução do comportamento sexual feminino é mediada principalmente pela

MPOA do hipotálamo e pelo VMH (122). O hipotálamo é responsável por adicionar o componente endócrino a esse mecanismo comportamental, uma vez que os efeitos do E2 e da P4 nas propriedades eletrofisiológicas dos neurônios, na transcrição do ácido ribonucleico (RNA) e na síntese novas proteínas e estruturas, são primariamente mediados nessa estrutura cerebral (123–125).

Em fêmeas ovariectomizadas e tratadas com E2 e P4, injeções intracerebroventriculares de OT podem aumentar a frequência e a duração de lordoses (126). Por exemplo, a ocorrência do comportamento sexual feminino requer a ação do E2 no cérebro e a indução de OTR no VMH (127). De fato, o RNA mensageiro para OTR está presente desde a região rostral até a parte caudal do VMH de fêmeas, sendo que a expressão do OTR aumenta na divisão ventrolateral do VMH em resposta ao E2 e a P4 (128).

A MPOA contribui significativamente para a motivação sexual (94) e para a modulação do comportamento sexual em machos (65), estando relacionada com a monta, a intromissão, a ejaculação e a cópula (129,130). Estudos revelam que lesões nessa área afetam diretamente a ocorrência do comportamento sexual em machos (88,129), podendo inclusive abolir completamente a sua ocorrência (131). Em contraste, a estimulação elétrica da MPOA em ratos reduz a latência e aumenta a frequência das ejaculações (65). A MeA interconecta-se com o MPOA e o BST para coordenar o processamento de informações de odores coespecíficos detectadas pelos sistemas olfativos principal e acessório (75). O BST e a MeA processam informações olfativas envolvidas no início do acasalamento, bem como aquelas relacionadas à ejaculação relevantes para a inibição do acasalamento.

Em machos, a OT representa um importante indutor do comportamento sexual, da excitação e do orgasmo (132). Em roedores, doses moderadas de OT podem facilitar a ereção peniana (133). No entanto, a OT é incapaz de induzir ereções sem a presença da testosterona, por isso, não ocorrem ereções penianas em animais castrados, mesmo com administração conjunta de OT (134). A área cerebral mais sensível para a indução da ereção peniana pela OT é o PVN, do qual se originam as projeções ocitocinérgicas extra-hipotalâmicas (135). Além disso, essa indução também ocorre quando a OT é injetada no hipocampo (CA1), na MPOA, no VMH e no SON (130). Quanto ao mecanismo pelo qual a OT atua no PVN para induzir essa resposta sexual, estudos sugerem que a OT ativa seus próprios neurônios. De acordo essa hipótese, a interação sexual aumenta a expressão de

FOS nos neurônios ocitocinérgicos do PVN que se projetam para a medula espinhal e estão envolvidos no controle da ereção peniana (121). Além disso, injeções intracerebroventriculares ou intraperitoneais de OT reduzem a latência para a ocorrência de uma ejaculação e tempo entre os acasalamentos (136).

1.5 Técnica de Golgi e Caracterização dos Neurônios da Amígdala Medial Pósterio-Dorsal

Em 1873, Camilo Golgi descreveu uma técnica de impregnação celular pela prata que foi fundamental para o entendimento da estrutura do tecido nervoso e de sua organização básica. A técnica de Golgi permite a visualização da célula nervosa inteira. No entanto, apenas uma pequena porção de células nervosas (1-10%) presentes no tecido é impregnada pela prata, adquirindo uma coloração negra que contrasta com o restante do tecido em cor amarelo-parda. Ademais, nem todas as regiões do SNC de diferentes espécies impregnam-se igualmente e, conforme avança a idade do animal, torna-se muito mais difícil obter bons resultados (83,137,138).

Os experimentos realizados em gatos, cachorros, camundongos e ratos evidenciaram, pela técnica de Golgi, uma morfologia neuronal relativamente simples e muito similar na MeA dessas espécies (139). Os neurônios são do tipo multipolar, com corpos ovais ou fusiformes e com tamanhos que variam de pequeno, com cerca de 8 a 10 μm de diâmetro médio, até médio, com aproximadamente 10 a 15 μm nessa medida (83). Os neurônios multipolares, característicos dessa região, são do tipo bifenachado (tradução livre para bitufted, do inglês) ou estrelado, conforme o número de ramificações dendríticas primárias originadas da soma celular. Sendo que os neurônios bifenachados apresentam dois ramos dendríticos primários surgindo do soma, enquanto que os estrelados possuem três ou mais ramos dendríticos primários (83,140).

A arborização dendrítica da MeA é esparsa, com ramos dendríticos grossos, razoavelmente retilíneos, longos ou de comprimento variável que se irradiam para direções variadas (83,139,140). A densidade de espinhos dendríticos nessa região varia de baixa a moderada (140). Pela análise ultraestrutural dos neurônios da MePD, as sinapses axodendríticas no tronco dos dendritos são as mais frequentemente observadas e, pelo aspecto morfológico, parecem ser principalmente

excitatórias (107). Os espinhos dendríticos geralmente são alvo de um único contato sináptico, aparentemente excitatório. Em concordância com isso, em ratos pré-púberes, registros eletrofisiológicos associados à microscopia eletrônica demonstraram que os potenciais excitatórios pós-sinápticos na MePD apresentam uma maior relação com a multiplicidade de contatos sinápticos, do que com uma maior liberação de neurotransmissores (141).

Os espinhos dendríticos, quando presentes, apresentam diferentes morfologias e encontram-se de forma aparentemente homogênea ao longo de cada dendrito, porém igualmente em alguns somas celulares e cones axonais (83,107,140). Em ratos, a densidade de espinhos dendríticos proximais na MePD é maior em machos do que em fêmeas nas fases de proestro, estro ou metaestro (140) e, ambos, apresentam redução na densidade de espinhos dendríticos após remoção dos hormônios gonadais (97). De fato, os hormônios gonadais influenciam na quantidade de neurônios (105), no volume celular (107), na orientação dendrítica (108), na densidade de espinhos dendríticos (39,97,104,140), nos contatos sinápticos (109) e no potencial excitatório pós-sináptico dessa estrutura (141). Durante o ciclo estral, as fêmeas na fase do proestro e do estro apresentam redução na densidade de espinhos dendríticos e na quantidade de sinapses na MePD (95,140).

1.6 Plasticidade Sináptica e Espinhos Dendríticos

Os espinhos dendríticos, que foram inicialmente descritos por Ramón y Cajal a mais de cem anos atrás, são pequenas protrusões membranosas dos ramos dendríticos de vários tipos de neurônios, incluindo os neurônios piramidais do neocórtex, os neurônios medianos do estriado e as células de Purkinje do cerebelo (142,143). Geralmente, as cabeças dos espinhos dendríticos formam sinapses excitatórias assimétricas com um axônio pré-sináptico, no entanto, conexões excitatórias e inibitórias podem estar ocorrendo de forma concomitante. Mais de 90% de todas as sinapses excitatórias que ocorrem no SNC estão localizadas nos espinhos dendríticos (144), que são os principais substratos celulares da conectividade e do processamento de informações cerebrais (145). A distribuição, a forma e o tamanho dos espinhos dendríticos estão diretamente relacionados com a

função do neurônio, portanto, a determinação do número de espinhos por segmento dendrítico ou densidade por micrômetro (μm) dendrítico pode ajudar a elucidar a atividade celular local e sua plasticidade (146). Os espinhos dendríticos apresentam propriedades cruciais para a plasticidade sináptica, assim como para a aprendizagem e para a memória (143,147).

Um espinho característico tem a forma determinada pela presença de uma “cabeça” (volume de aproximadamente $0,001$ a $1 \mu\text{m}^3$) conectada ao neurônio por um “pescoço” (diâmetro menor que $0,1 \mu\text{m}$; 143). Os receptores para os neurotransmissores são restritos à superfície do espinho e confinados em aposição ao elemento pré-sináptico (148). Essa zona do espinho é indicada pela densidade pós-sináptica (PSD), uma zona de material elétron-denso que consiste de receptores, canais e sistemas de sinalização intracelular envolvidos na transmissão sináptica e no acoplamento da atividade sináptica às alterações bioquímicas pós-sinápticas (149). A cabeça do espinho contém a PSD e algumas estruturas especializadas, como os filamentos de actina. Embora mitocôndrias e microtúbulos estejam ausentes, os espinhos tem retículo endoplasmático liso, o qual está associado a um mecanismo neuroprotetor que permite a manutenção da concentração de cálcio intracelular (142,144,150). Em alguns espinhos, os polirribossomos e os elementos da via lisossomal-endossomal estão presentes, indicando a possibilidade de síntese proteica local e degradação de elementos citoplasmático ou de membrana celular (151).

Os canais iônicos na PSD convertem os sinais químicos dos neurotransmissores em fluxo iônico através da membrana celular, o que gera modificações na voltagem local e outras modificações pós-sinápticas (149). Dessa forma, modificações na morfologia dos espinhos dendríticos podem alterar a transdução de sinal por proporcionar um grau variado de compartimentalização bioquímica (152). Por exemplo, o pescoço estreito do espinho pode prevenir o aumento do cálcio citoplasmático, ou como alternativa, se houver menor resistência, possibilitar que a concentração de cálcio seja rapidamente dissipada dentro do dendrito e se difunda para os espinhos próximos. Isto pode facilitar a modificação da corrente elétrica local e auxiliar na ocorrência da potencialização de longo prazo (LTP; 144,149). Os espinhos também podem representar compartimentos elétricos, nos quais a geometria do pescoço atua como um elemento de resistência à passagem de corrente elétrica para o dendrito. Assim, o pescoço pode proporcionar

uma diferença de potencial elétrico local, podendo ativar canais iônicos dependentes de voltagem ou impor uma diferença na capacitância, de acordo com as propriedades ativas e passivas existentes no local (149).

Uma característica peculiar dos espinhos dendríticos é a sua variabilidade morfológica. Este processo reflete o rearranjo rápido do citoesqueleto de actina no seu interior, o que pode levar à mudanças no tamanho e no número de espinhos. A morfologia dos espinhos dendríticos é altamente variável e geralmente classificada em três tipos: fino, cogumelo e espesso (Figura 3; 143,144). Os espinhos serão classificados como finos, se o comprimento for maior que o diâmetro do pescoço (D_n), e ainda, o diâmetro da cabeça (D_h) e D_n forem semelhantes.

O espinho com morfologia de cogumelo apresenta o D_h maior que o D_n . Os espinhos serão considerados espessos quando não houver diferença entre o comprimento e o diâmetro. Os espinhos dendríticos não apresentam mais do que 3 μm de comprimento. Os filopódios, que são considerados os precursores ou as formas imaturas dos espinhos dendríticos, apresentam entre 3 μm e 10 μm de comprimento.

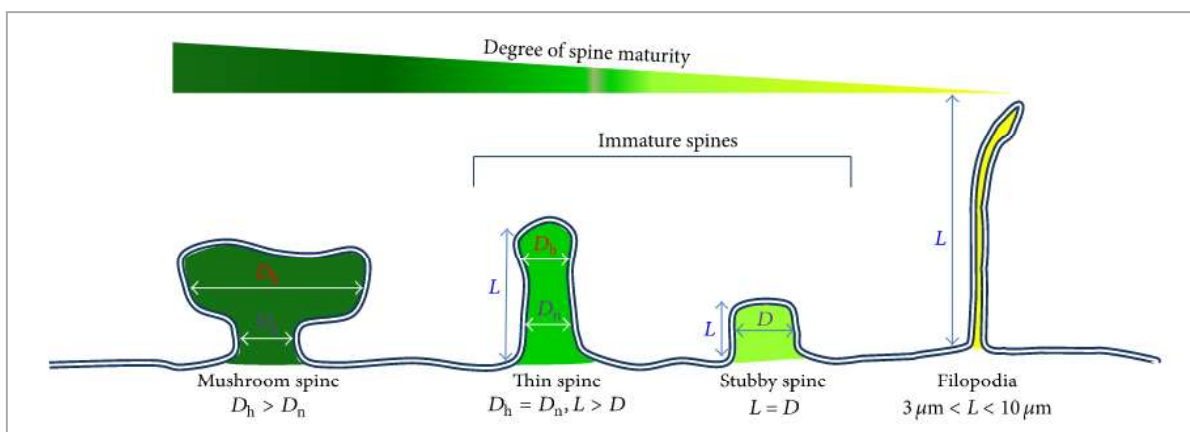


Figura 3. Diagrama de Espinhos Dendríticos. Os espinhos dendríticos são classificados em cogumelos, finos e espessos. Comprimento (L), diâmetro da cabeça (D_h) e diâmetro do pescoço (D_n) dos espinhos dendríticos. O filopódio é considerado o precursor dos espinhos dendríticos. **Adaptado de:** <https://www.hindawi.com/journals/np/2016/8056370/>

As diferentes morfologias de espinhos dendríticos parecem ser reguladas por uma via que é dependente da atividade sináptica local, envolvendo o influxo de cálcio através dos receptores glutamatérgicos e dos receptores de cálcio dependentes de voltagem (155). Em uma cultura de neurônios, a ativação dos

receptores glutamatérgicos do tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA) proporciona um rápido e transitório aumento no tamanho dos espinhos pré-existentes e na formação gradual de novos espinhos (156).

Os diferentes tipos de espinhos estão relacionados com diferentes funções, por isso mudanças na densidade desses espinhos podem ter importantes efeitos na excitabilidade e na função neuronal (157,158). Os espinhos do tipo fino estão relacionados com o aprendizado e os do tipo cogumelo são responsáveis pela manutenção das redes neurais e pela memória de longo prazo (159). Os espinhos finos e espessos, assim como os filopódios, são os mais comuns durante o desenvolvimento, apresentando maior imaturidade e plasticidade (160). Nos espinhos cogumelos, o pescoço representa uma estrutura extremamente importante, uma vez que evita as trocas de Ca^{2+} entre a cabeça e o segmento dendrítico.

Além de permitir a regulação da transmissão sináptica, essa estrutura possui um efeito neuroprotetor, uma vez que previne a excitotoxicidade ao restringir influxos excessivos de Ca^{2+} na região sináptica (149,150). Associada a uma maior estabilidade, os espinhos com morfologia de cogumelo apresentam maior quantidade de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) em comparação com espinhos finos. Podem também associar-se com os terminais pré-sinápticos astrogliais, o que aumenta a formação, a estabilização e a eliminação de sinapses (161). Por fim, a densidade normal de espinhos dendríticos varia entre 0,2 a 3,5 espinhos por 1 μm dendrítico, sendo que esta variação está relacionada com o tipo de neurônio, com a idade, com a posição ao longo do dendrito e com a metodologia utilizada para realizar a contagem (142,149,154).

2. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos vem demonstrando o importante papel da OT na modulação dos comportamentos sociais tanto entre as espécies quanto ao longo da vida (10,14–16). No entanto, seus efeitos individuais variam muito, não apenas entre as espécies, mas, também, dentro da mesma espécie. Isso pode ser observado quando comparamos seus diferentes efeitos entre machos e fêmeas ou em diferentes regiões do cérebro. Além disso, a fase da vida do animal e o contexto social que este se encontra alteram a maneira como o cérebro responde aos processos modulatórios que ocorrem no SNC. Dessa forma, a compreensão de como esse neuropeptídeo afeta comportamentos intra e interespecíficos nos indivíduos é importante para o entendimento dos comportamentos sociais.

Dados prévios do nosso laboratório demonstraram que, em roedores machos, o comportamento sexual não foi afetado pela falta de OT (52). Por outro lado, durante a fase do proestro, as fêmeas nocautes para o gene da OT apresentaram uma diminuição significativa no comportamento sexual e um aumento na densidade de espinhos dendríticos nos neurônios da MePD quando comparadas ao grupo controle (51).

A MePD está envolvida no processamento feromonal e na reprodução expressando altas concentrações de receptores de testosterona, E2, P4 e OT. Portanto, as diferenças comportamentais observadas entre machos e fêmeas certamente relaciona-se com as flutuações dos esteróides gonadais e, com a liberação local de OT nos neurônios da MePD.

Considerando que as experiências sociais promovem uma série de mudanças fisiológicas e comportamentais, este trabalho testou as hipóteses geradas por resultados comportamentais anteriores (51,52), para isso foram utilizadas abordagens experimentais visando especificamente a MePD. Neste estudo visamos aprofundar o estudo morfométrico dos neurônios da MePD nos animais OTKO com o objetivo de avançar na compreensão das redes neurais relacionadas aos comportamentos sociais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo analisar o impacto do nocauteamento do gene da OT na morfologia e na densidade de espinhos dendríticos dos neurônios da MePD de camundongos fêmeas e machos.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a morfologia e a densidade de espinhos nos primeiros 40 μm dendríticos dos neurônios da MePD de fêmeas OTKO nas fases de diestro e proestro (Artigo 1 e Resultados Adicionais);

- Analisar a morfologia e a densidade de espinhos nos primeiros 40 μm dendríticos dos neurônios da MePD de machos OTKO sem e com experiência sexual (Artigo 2);

- Determinar o efeito da experiência sexual na morfologia e na densidade de espinhos dendríticos dos neurônios da MePD de machos (Artigo 2).

4. ARTIGOS

4.1 Artigo 1: Differently shaped spines increase in the posterodorsal medial amygdala of oxytocin knockout female mice.

Roberta Oriques Becker^a, Aline Dall'Oglio^b, Katya Rigatto^{a,b}, Márcia Giovenardi^{a,b,1}, Alberto A. Rasia-Filho^{b,c,1}

^a Graduation Program in Health Sciences, Federal University of Health Sciences, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^b Department of Basic Sciences, Division of Physiology, Federal University of Health Sciences, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Graduation Program in Neurosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

¹ These authors contributed equally to the present study.

Revista escolhida: Neuroscience Research

Fator de Impacto: 2,004

Link para acesso on-line:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168010215001790>

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.07.001>



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Research

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

Rapid Communication

Differently shaped spines increase in the posterodorsal medial amygdala of oxytocin knockout female mice



Roberta Oriques Becker^a, Aline Dall'Oglio^b, Katya Rigatto^{a,b}, Márcia Giovenardi^{a,b,*,1}, Alberto A. Rasia-Filho^{b,c,*,1}

^a Graduation Program in Health Sciences, Federal University of Health Sciences, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Department of Basic Sciences, Division of Physiology, Federal University of Health Sciences, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Graduation Program in Neurosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 May 2015

Received in revised form 12 June 2015

Accepted 1 July 2015

Available online 9 July 2015

Keywords:

Extended amygdala

OTKO

Spine shape

Synaptic plasticity

ABSTRACT

The posterodorsal medial amygdala (MePD) is a sexually dimorphic area in the social behavior neural network, with high concentration of oxytocin (OT) receptors. Wild type (WT) and OT knockout (OTKO) females were studied in proestrus, and Golgi-impregnated spines in the MePD were classified. Results show that the OTKO group has increased density of thin, mushroom, and stubby/wide spines when compared to the WT ($p < 0.01$ in all cases). These data indicate that OT is an important synaptic modulator in the MePD, a finding that is likely involved with the display of the female sexual behavior.

© 2015 Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

Oxytocin (OT) has been implicated in the modulation of social behaviors (Choleris et al., 2009), including parental, affiliative, aggressive, social memory, pair bonding, and sexual display in rats and mice (Russell et al., 2003; Neumann, 2008; Lee et al., 2009). OT has sexually dimorphic effects. Although the selective deletion of the OT gene in knockout mice (OTKO) does not impair the reproductive behavior in males (Lazzari et al., 2013), OT in females is important to coordinate the onset of puberty and the cyclic gonadotrophin releasing hormone (GnRH) secretion, mainly acting in the hypothalamic ventromedial nucleus (VMH) and in the medial preoptic area (MPOA) (Becker et al., 2013 and references therein), areas that also control the display of lordosis behavior during mating (Kow and Pfaff, 1998).

Recently, we found that OTKO females in proestrus decreased sexual behavior and had a significantly higher density of dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala (MePD) compared to wild-type (WT) mice (Becker et al., 2013). The MePD has one of

the highest expressions of receptors for gonadal hormones in the brain, has a notable concentration of OT receptors, and is a nodal point in the social behavior neural network (Veinante and Freund-Mercier, 1997; Newman, 1999; De Olmos et al., 2004; Rasia-Filho et al., 2012a; Becker et al., 2013; Quagliotto et al., 2014 and references therein). Indeed, differences between males and females were found in the MePD volume, neuron and glial cells number, spatial orientation of the dendritic branches, density of dendritic spines, synaptic connectivity, neurotransmitter binding sites, and local expression of various neuropeptides (reviewed in Rasia-Filho et al., 2012a,b and references therein). It is noteworthy that dendritic spines are specialized postsynaptic elements that have crucial properties for synaptic formation, strength, and plasticity (Bourne and Harris, 2007; Rochefort and Konnerth, 2012). The density of dendritic spines in the MePD of female rats changes in the course of hours to few days and is lower in the proestrus and estrus (Rasia-Filho et al., 2004). This indicates a cyclic, variable synaptic input processing in the MePD that, acting in hypothalamic integrated circuits, is likely involved with the timely neuroendocrine secretion and reproductive behavior display of females (Rasia-Filho et al., 2012a,b; Brusco et al., 2014). This process is evidently impaired in OTKO mice (Becker et al., 2013).

Although there are relevant data that support the idea of a direct structure-function coupling to differently shaped dendritic spines (Bourne and Harris, 2007; Kasai et al., 2010), this issue has not reached a definite consensus. Rather, it is likely that the labile or the

* Corresponding authors at: Department of Basic Sciences, Division of Physiology, Federal University of Health Sciences, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

E-mail addresses: gjovenardi.marcia@gmail.com (M. Giovenardi),

rasiafilho@pq.cnpq.br (A.A. Rasia-Filho).

¹ These authors contributed equally to the present study.

stable aspect of a dendritic spine depends on the specific synaptic demand and the function at each single spine level and brain region studied (Nimchinsky et al., 2002; Segal, 2010; Spruston et al., 2013). Here, we add new data to the previously reported increase in the local density of dendritic spines in the MePD of OTKO female mice by testing if this effect can be attributed to a specific type of spine. If so, a subpopulation of dendritic spines could be mainly altered by the specific synaptic demand change in the MePD following the selective deletion of the OT gene and the disrupted oxytocinergic transmission.

2. Materials and methods

We have employed the same methodological procedure described in Becker et al. (2013). That is, the mice were the offspring of a backcrossed stock obtained from Dr. W. Scott Young (B6; 129S-OxTtm1Wsy/J; NIMH, USA). All animals were littermates from heterozygous breeders (C57BL/6 mice). Genotyping was described in details previously (Becker et al., 2013).

Adult females ($N=12$, weighing 25–35 g, and 5–8 months old) were housed in ventilated transparent acrylic cages (37 cm × 24 cm × 24 cm) and grouped with up to 4 same-sex individuals under room temperature at 22 ± 1 °C and a 12:12 light–dark cycle. The mice had access to food and water ad libitum. All procedures were conducted in accordance with the national and international regulations for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85–23, reviewed 1985, USA) and were approved by the local Ethics Committee (UFCSA, Brazil, protocol no. 920/09).

Both WT and OTKO females ($n=6$ in each group) had their estrous cycle phase determined daily (in the late afternoon) according to cytological criteria of the vaginal smears examined under light microscopy. The phases of the estrous cycle were monitored along 2 weeks and regularly cycling females in proestrus were used in this study.

The “single-section” Golgi method was performed as already reported (Becker et al., 2013). Briefly, females were deeply anesthetized with intraperitoneal injections of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Tissue fixation was obtained after rapid transcardial perfusion with 4% paraformaldehyde and 2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4). The brains were sectioned coronally (150- μ m thick) using a vibratome (Leica, Germany), and put in solutions of 3% potassium dichromate (Merck, Germany) and 1.5% silver nitrate (Merck, Germany) for 24 h and 48 h, respectively. The MePD was studied from 1.46 to 1.94 mm posterior to the bregma, laterally to the optic tract and the “molecular layer”, and ventrally to the stria terminalis, according to the atlas of Franklin and Paxinos (1997).

The including criteria for the study of MePD neurons were: (a) to be undoubtedly located within the boundaries of the intended area in both hemispheres; (b) to be relatively isolated from neighboring impregnated cells to avoid “tangled” dendrites; (c) dendrites should have well-impregnated and defined borders; and (d) spines should be clearly distinguishable from the background [6]. Proximal dendrites that fulfilled these criteria had their spines drawn along the different focal planes in “z” using a camera lucida (2000×; i.e., 100× oil-immersion objective lens and 20× ocular lens) coupled to an optic microscope (Olympus BX-41, Japan). For each female, 8 different dendrites were studied with 1 dendrite per sampled neuron. The 3 main differently shaped spines found in the MePD were identified and counted from these samples. That is, the morphological features of the spine head and neck allowed spine classification as thin, mushroom or stubby/wide (as in Brusco et al., 2010). In principle, a salient round broadening on a dendritic shaft was not considered a stubby spine. Other spine shapes

(ramified or atypical) were not usually seen. After this procedure, three-dimensional dendritic lengths were measured from the same microscopic images (400×; Olympus BX-61, Japan) and the images of the selected dendrites were captured by a high-resolution digital camera (CCD DP72, Japan) and measured using the Image Pro Plus 7.0 computer software (Media Cybernetics, USA). Dendritic length sampled varied from 30 to 60 μ m in both groups [mean \pm standard deviation (SD) values of 41 ± 5 μ m and 39 ± 7 μ m for WT and OTKO mice, respectively]. The density of each type of spine was defined as the number of spines per unit length of dendritic segment (in μ m; Rasia-Filho et al., 2004).

We calculated the mean values for the densities of each type of dendritic spine for each animal and respective groups. Data were compared using a two-way ANOVA for repeated measures followed by the Bonferroni test. The statistical level of significance was set as $p < 0.05$. Data were analyzed using Prism software (GraphPad, USA).

3. Results

Representative images of Golgi-impregnated spiny neurons in the MePD of WT and OTKO females are shown in Fig. 1 (top).

Thin spines were more commonly (~51%) found in both groups. Minimum to maximum ranges for the MePD spine density of the different spine shapes observed in the WT and the OTKO groups were, respectively: 0.7–1.2 and 0.9–1.9 for thin spines/dendritic μ m, 0.3–0.5 and 0.5–1.0 for mushroom spines/dendritic μ m, and 0.2–0.6 and 0.3–0.8 for stubby/wide spines/dendritic μ m.

Mean \pm standard deviation data for the density of each type of dendritic spine are shown in Fig. 1 (bottom). There were highly significant differences between the studied groups [$F(1,30)=112.13$, $p < 0.01$], the spine types [$F(2,30)=1229.99$, $p < 0.01$], and the interaction of these two factors [$F(2,30)=25.58$, $p < 0.01$]. The post hoc comparisons showed that the OTKO group had a significant increase in the proximal density of thin ($p < 0.01$), mushroom ($p < 0.01$), and stubby/wide ($p < 0.01$) spines when compared to WT group. The increase in thin and stubby/wide spines was up to 16% and 20%, respectively, whereas mushroom spines were 65% higher in OTKO mice.

4. Discussion

Our present results reinforce that OTKO females in proestrus have a higher number of proximal dendritic spines than WT mice (cf. Becker et al., 2013) and add the new finding that this spine density increase in OTKO mice involves differently shaped spines. Thin spines represent half of all observed shapes in both groups, but the number of thin, mushroom, and stubby/wide spines was consistently higher in proximal dendrites of OTKO mice than in WT females. Notably, these data also indicate that mushroom spines were the type that showed more intense effects following the selective deletion of the OT gene and the altered oxytocinergic transmission to and/or within the MePD. These results were consistently found in the MePD since results obtained from randomly Golgi-impregnated neurons showed a low variability, as assessed by standard deviation values and the high statistical level of significance reached.

Therefore, there is an altered local synaptic processing in the MePD involving both the number and the shape of dendritic spines in OTKO mice. From data obtained in rats, most MePD axo-spine contacts are excitatory (Brusco et al., 2014), and the number of spines is normally affected by fluctuations in ovarian steroids (e.g., reducing 35% from diestrus to proestrus; Rasia-Filho et al., 2004, 2012a). These latter finding highlights the proportion of MePD spines that show labile excitatory inputs and are dynamically

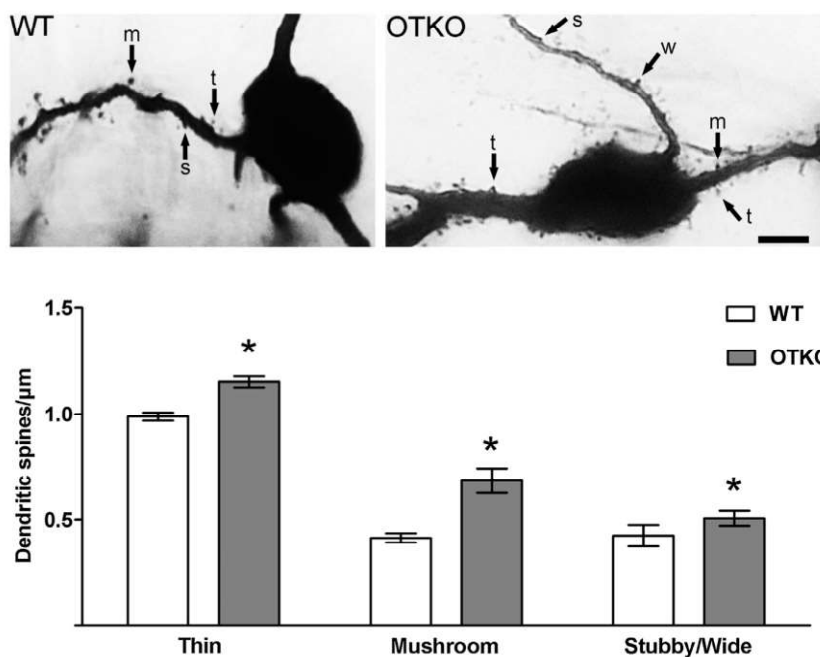


Fig. 1. (Top) Photomicrographs showing representative Golgi-impregnated neurons from the posterodorsal medial amygdala of control, wild type (WT) and oxytocin knockout (OTKO) female mice studied in proestrus. Arrows point to differently shaped proximal dendritic spines classified as thin (t), mushroom (m) or stubby/wide (s, w). Bar = 5 μm. (Bottom) Mean (±SD; n = 6 rats in each group) of the number of differently shaped spines from proximal dendrites of neurons from the MePD of WT and OTKO females. OTKO females had a higher density of all types of dendritic spines compared to WT. Mushroom-shaped spines showed the highest proportional increase in OTKO females. * $p < 0.01$ compared to WT data.

modulated by ovarian steroids contrasting with the remaining proportion that might represent more stable spines. Therefore, the values found for the increase in the density of spines in the MePD in OTKO females in proestrus (near 25% higher than WT counterparts; cf. Becker et al., 2013) and the marked increment of differently shaped spines (from 16 to 20% to 65%) can be considered substantial and consistent for this area in the mice brain.

It is interesting to consider that OT can be an important synaptic modulator of the dynamic change of the number of dendritic spines in the MePD. Indeed, OTKO proestrus mice show the opposite effect on the density of spines than the observed in the MePD of proestrus female rats due to the rise of circulating estrogen and progesterone. That is, OTKO mice show high values and not a downregulated hormonally-mediated density of spines. Furthermore, OTKO have differently shaped spines that can impact on the MePD synaptic processing. For example, although thin spines with long necks can display chemical and electrical compartmentalizations, mushroom-shaped spines have large heads and postsynaptic densities that directly correlate with the number of excitatory AMPA-type glutamate receptors and synaptic strength (Spruston et al., 2013). Stubby/wide spines can have a low resistance and promptly combine their local synaptic voltage to the parent dendritic shaft (Segal, 2010). Considering that projections from the MePD are mainly inhibitory, the maintenance and/or the amplification of an abnormal excitatory drive to the MePD neurons is likely to disrupt normal cyclic changes in the female brain and behavior (further discussed in Rasia-Filho et al., 2012a). Altogether, the altered spine density and shape in the MePD might affect the synaptic processing and the information flow in integrated circuits relevant for ovulation as well as the connections with hypothalamic nuclei relevant to the proper display of the female sexual behavior and the formation of social memory, which OT has a well-known

participation in physiological conditions and OTKO females show clear impairments (Becker et al., 2013 and references therein).

Other possibilities for the functional implication of the disrupted OT synthesis and transmission reaching the MePD spines involve the pheromonal recognition of conspecific mice (Ferguson et al., 2001), the organization of approach or avoidance behaviors (Arakawa et al., 2010), the emotional processing of social interactions, and/or the coupling of somatic-sympathetic/parasympathetic responses with an indirect effect on the central cardiovascular control (Quagliotto et al., 2014 and references therein). Additional efforts involving ultrastructural 3D reconstructions of spines and immunolabeling of presynaptic terminals, and electrophysiological experiments involving the response of differently shaped spines can test how complex is the interaction of the altered synaptic demand and processing in OTKO females associated with changing levels of ovarian steroids in the mice MePD. It is possible that OT can modulate the decrease of the number of dendritic spines and affect spine morphology during the proestrus either by direct effects in the MePD circuitry or by indirect actions on incoming pathways. Mushroom-shaped spines are particularly highly sensitive to these OT effects.

Our results add to the notion that OT is an important synaptic modulator in the MePD and can modulate the number of differently shaped spines with functional implications on the reproductive regulation of female mice.

Acknowledgments

Authors are thankful to Dr. Mariana Morris (Wright State University, USA) for her support with the transgenic animals. KVR and AARF are CNPq (Brazil) researchers.

References

- Arakawa, H., Arakawa, K., Deak, T., 2010. Oxytocin and vasopressin in the medial amygdala differentially modulate approach and avoidance behavior toward illness-related social odor. *Neuroscience* 171, 1141–1151.
- Becker, R.O., Lazzari, V.M., Menezes, I.C., Morris, M., Rigatto, K., Lucion, A.B., Rasia-Filho, A.A., Giovenardi, M., 2013. Sexual behavior and dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons in oxytocin knockout female mice. *Behav. Brain Res.* 256, 95–100.
- Bourne, J.N., Harris, K.M., 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 381–386.
- Brusco, J., Dall'Oglio, A., Rocha, L.B., Rossi, M.A., Moreira, J.E., Rasia-Filho, A.A., 2010. Descriptive findings on the morphology of dendritic spines in the rat medial amygdala. *Neurosci. Lett.* 483, 152–156.
- Brusco, J., Merlo, S., Ikeda, É.T., Petralia, R.S., Kachar, B., Rasia-Filho, A.A., Moreira, J.E., 2014. Inhibitory and multisynaptic spines and hemispherical synaptic specialization in the posterodorsal medial amygdala of male and female rats. *J. Comp. Neurol.* 522, 2075–2088.
- Choleris, E., Clipperton-Allen, A.E., Phan, A., Kavaliers, M., 2009. Neuroendocrinology of social information processing in rats and mice. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 442–459.
- De Olmos, J., Beltramo, C.A., Alheid, G.F., 2004. Amygdala and extended amygdala of the rat: cytoarchitectonical, fibroarchitectonical and chemoarchitectonical survey. *The Rat Nervous System*, vol. 1. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 509–603.
- Ferguson, J.N., Aldag, J.M., Insel, T.R., Young, L.J., 2001. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J. Neurosci.* 21, 8278–8285.
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 1997. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, pp. 190.
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., Noguchi, J., 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci.* 33, 121–129.
- Kow, L.M., Pfaff, D.W., 1998. Mapping of neural and signal transduction pathways for lordosis in the search for estrogen actions on the central nervous system. *Behav. Brain Res.* 92, 169–180.
- Lazzari, V.M., Becker, R.O., Azevedo, M.S., Morris, M., Rigatto, K., Almeida, S., Lucion, A.B., Giovenardi, M., 2013. Oxytocin modulates social interaction but is not essential for sexual behavior in male mice. *Behav. Brain Res.* 244, 130–136.
- Lee, H.J., Macbeth, A.H., Pagani, J.H., Young III, W.S., 2009. Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog. Neurobiol.* 88, 127–151.
- Neumann, I.D., 2008. Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J. Endocrinol.* 20, 858–865.
- Newman, S.W., 1999. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877, 242–257.
- Nimchinsky, E.A., Sabatini, B.L., Svoboda, K., 2002. Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 313–353.
- Quagliotto, E., Casali, K.R., Dal Lago, P., Rasia-Filho, A.A., 2014. Neuropeptides in the posterodorsal medial amygdala modulate central cardiovascular reflex responses in awake male rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 12, 1–14.
- Rasia-Filho, A.A., Fabian, C., Rigoti, K., Achaval, M., 2004. Influence of sex, estrous cycle and motherhood in dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience* 126, 839–847.
- Rasia-Filho, A.A., Dalpian, F., Menezes, I.C., Brusco, J., Moreira, J.E., Cohen, R.S., 2012a. Dendritic spines of the medial amygdala: plasticity, density, shape, and subcellular modulation by sex steroids. *Histol. Histopathol.* 27, 985–1011.
- Rasia-Filho, A.A., Haas, D., De Oliveira, A.P., De Castilhos, J., Frey, R., Stein, D., Lazzari, V.M., Back, F., Pires, G.N., Pavesi, E., Winkelmann-Duarte, E.C., Giovenardi, M., 2012b. Morphological and functional features of the sex steroid-responsive posterodorsal medial amygdala of adult rats. *Mini Rev. Med. Chem.* 12, 1090–1106.
- Rocheffort, N.L., Konnerth, A., 2012. Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Rep.* 13, 699–708.
- Russell, J.A., Leng, G., Douglas, A.J., 2003. The magnocellular oxytocin system, the fount of maternity: adaptations in pregnancy. *Front. Neuroendocrinol.* 24, 27–61.
- Segal, M., 2010. Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability. *Eur. J. Neurosci.* 31, 2178–2184.
- Spruston, N., Häusser, M., Stuart, G., 2013. Information processing in dendrites and spines. In: Squire, L.R., Berg, D., Bloom, F.E., et al. (Eds.), *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, Waltham, pp. 231–260.
- Veinante, P., Freund-Mercier, M.J., 1997. Distribution of oxytocin- and vasopressin-binding sites in the rat extended amygdala: a histoautoradiographic study. *J. Comp. Neurol.* 383, 305–325.

4.1.1. RESULTADOS ADICIONAIS: Análise da densidade e da morfologia de espinhos dendríticos na amígdala medial póstero-dorsal de fêmeas na fase do diestro que eram nocaute para o gene da ocitocina.

Com o objetivo de complementar as análises realizadas no artigo 1 desta tese, foi estudado também a densidade e as diferentes morfologias de espinhos dendríticos na MEPD de fêmeas nocaute para o gene da ocitocina (OTKO) durante a fase de diestro. Nesse contexto, foram utilizados 12 camundongos fêmeas (Controle, WT=6; OTKO=6) originários da linhagem C57BL/6J, pesando de 25 a 35 g, entre 5 a 8 meses de idade, mantidos em sala destinada para camundongos no biotério da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Os animais permaneceram em uma sala com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso à água e a ração. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (2011) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFCSPA (protocolo nº131/13).

Para a realização do procedimento histológico, a regularidade do ciclo estral foi averiguada através do monitoramento diário durante quinze dias, através da técnica de esfregaço vaginal. A secreção vaginal foi coletada através do lavado com 10 μl de solução salina utilizando uma pipeta de plástico, após isso o material foi colocado em uma lâmina e analisado no microscópio óptico. As fases do ciclo estral foram classificadas da seguinte forma: diestro: muitos leucócitos e poucas células nucleadas; proestro: predominância de células nucleadas; estro: predominância de células cornificadas; metaestro: mesma proporção de leucócitos, células cornificadas e células nucleadas. Ao final dos quinze dias, somente as fêmeas com três ciclos estrais regulares consecutivos e que estivessem na fase do diestro foram selecionadas para o estudo.

A técnica de Golgi foi realizada de acordo com as descrições de Becker et al. (11,51). Para a realização dessa técnica os animais foram anestesiados intraperitonealmente com quetamina (80 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg). Sob anestesia profunda foi realizada a abertura da caixa torácica pela dissecação das partes laterais e ventral do diafragma e rebatimento da porção ventral do gradil costal. Com a visualização do coração, foram injetados 500 μl de heparina (5.000 UI/ml)

diretamente no ventrículo esquerdo. Após esse procedimento, foi inserida no ventrículo esquerdo uma agulha sem bixel conectada a um sistema de perfusão, que teve como objetivo realizar a substituição do sangue por uma solução contendo paraformaldeído a 4% e ácido pícrico a 2% diluídos em tampão fosfato 0,1 M e pH=7,4. Os encéfalos foram perfundidos utilizando uma bomba peristáltica, retirados e pós-fixados na mesma solução fixadora por 24 horas. Os encéfalos foram seccionados em secções coronais de 150 µm de espessura no vibrátomo. O atlas das coordenadas estereotáxicas do encéfalo de camundongo elaborados por Franklin e Paxinos (162; Figura 1) foi utilizado como referencial teórico. Os cortes contendo a MePD foram imersos na solução de dicromato de potássio a 3% dissolvido na água bidestilada e sem íons por 24 horas e ao abrigo de luz. Após, as secções foram lavadas em água destilada, colocadas entre lamínulas e submersas no nitrato de prata a 1,5% dissolvido em água bidestilada e sem íons, resguardados da luz por no mínimo 48 horas a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados com água destilada, desidratados em soluções crescentes de álcool, diafanizados com xilol, montados em lâminas histológicas e cobertos com bálsamo do Canadá e lamínula.

Para a análise histológica, a MePD foi localizada lateralmente ao trato óptico e a "camada molecular" e ventralmente a estria terminal. Imagens microscópicas de cada corte do encéfalo foram comparadas com os desenhos esquemáticos apresentados no atlas do encéfalo do camundongo (162). Foram selecionados os locais que apresentaram neurônios na MePD para o estudo no microscópio de luz (Olympus BX-41, Japão). Os neurônios que foram selecionados para o estudo seguiram os seguintes critérios de inclusão: a) estavam localizados indubitavelmente na região desejada, isto é, na MePD, mas relativamente afastados dos bordos limítrofes, como preocupação para não se coletar dados de outras áreas vizinhas à área de interesse; b) tinham, no mínimo, seus primeiros 40 µm bem impregnados; c) tinham os espinhos dendríticos claramente distinguíveis do "fundo" dos cortes e dos precipitados inespecíficos de prata; d) estavam relativamente isolados das células vizinhas (108,140).

Para cada animal, os primeiros dendritos que preencheram os critérios de inclusão acima mencionados tiveram seus espinhos desenhados com o auxílio da câmara clara (2000x, ou seja, 100x da lente objetiva com imersão em óleo e 20x da lente ocular) acoplada ao um microscópio óptico (Olympus BX-41, Japão). Os

espinhos dendríticos foram classificados conforme a sua morfologia (fino, espesso e cogumelo; 97, 140). A densidade de espinhos dendríticos foi calculada como sendo a relação do número total de espinhos dendríticos de cada tipo morfológico dividido pelo comprimento dendrítico estudado, o qual foi mensurado utilizando o programa de análise de imagens (Image Pro Plus 7.0, Media Cybernetics, EUA). Foram estudados oito diferentes dendritos de diferentes neurônios de cada animal que compõe os 8 grupos experimentais, perfazendo um total de 48 dados por grupo experimental. Foram calculados os valores médios da densidade de espinhos dendríticos para cada tipo morfológico, por animal e por grupo experimental. Os dados referentes à densidade de espinhos dendríticos de cada tipo morfológico nos neurônios da MePD de camundongos fêmeas em proestro, anteriormente publicados em Becker et al (11), foram utilizados para realizar comparações com os grupos em diestro. Portanto, foram analisados os dados de quatro grupos experimentais (Fêmeas WT em diestro; Fêmeas OTKO em diestro; Fêmeas WT em proestro; Fêmeas OTKO em proestro) que foram submetidos às mesmas condições experimentais acima descritas. Os dados foram comparados através do teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. O nível de significância estatístico foi estabelecido em $P < 0.05$. Os dados foram analisados utilizando o software Prism (GraphPad, EUA).

Para análise desta parte da tese, nós reunimos os resultados já publicados do proestro (Artigo 1) com os resultados da fase de diestro, com o objetivo de enriquecer esta análise.

Na figura 2, os dados referentes à densidade de espinhos dendríticos de cada tipo morfológico nos neurônios da MePD das fêmeas em proestro e diestro estão representados como média \pm desvio padrão. Ocorreram diferenças significativas entre os grupos estudados [$F(3,60) = 98.20, P < 0.0001$], os tipos de espinhos dendríticos [$F(2,60) = 1366.32, P < 0.0001$], e a interação entre esses dois fatores [$F(6,60) = 8.88, P < 0.0001$]. As comparações referentes ao teste *post hoc* mostraram que o grupo OTKO/Proestro não apresentou uma diferença significativa na densidade de espinhos dendríticos dos tipos fino ($P > 0.05$), cogumelo ($P > 0.05$) e achatado ($P > 0.05$) quando comparado ao grupo OTKO/Diestro. No entanto, esse efeito foi observado quando comparamos os grupos WT/Proestro e WT/Diestro em relação aos três tipos morfológicos de espinhos dendríticos ($P < 0.001$). Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos WT/Diestro e

OTKO/Diestro em relação aos três tipos morfológicos de espinhos dendríticos ($P>0.05$). Por fim, como foi anteriormente demonstrado em Becker et al (2015), durante o proestro, o grupo OTKO apresenta uma maior densidade de espinhos dendríticos dos tipos fino ($P<0.01$), cogumelo ($P<0.01$) e achatado ($P<0.01$) quando comparado ao grupo WT. Portanto, durante o diestro, as fêmeas dos grupos WT e OTKO não apresentaram diferenças significativas em relação à densidade de espinhos dendríticos nos neurônios da MePD. No entanto, na passagem para a fase do proestro, observou-se, no grupo WT, uma redução significativa na densidade de espinhos dendríticos dos três tipos morfológicos estudados, efeito que não foi observado no grupo OTKO.

Em fêmeas, durante o diestro, os grupos OTKO e WT não apresentaram diferenças significativas em relação à densidade de espinhos dendríticos nos neurônios da MePD. No entanto, na passagem para a fase do proestro, observou-se, no grupo WT, uma redução significativa na densidade de espinhos dendríticos dos três tipos morfológicos estudados. Essa redução não foi observada no grupo OTKO em proestro. Durante o proestro, o grupo OTKO apresentou uma maior densidade de espinhos dendríticos na MePD quando comparado ao grupo WT. Notavelmente, essa maior densidade de espinhos dendríticos estava relacionada com os três tipos morfológicos estudados, porém, os espinhos do tipo cogumelo foram os que evidenciaram com maior intensidade os efeitos da deleção seletiva do gene da OT e das alterações na transmissão ocitocinérgica. Considerando que as projeções diretas e indiretas da MePD para as áreas hipotalâmicas relacionadas ao comportamento sexual são GABAérgicas, a redução dos espinhos dendríticos na MePD proporciona a desinibição necessária para a ocorrência do comportamento sexual em fêmeas. Dessa forma, podemos considerar a OT um importante modulador sináptico das mudanças dinâmicas que ocorrem na densidade de espinhos dendríticos na MePD ao longo do ciclo estral, uma vez que, nos camundongos OTKO uma maior densidade ou uma não redução da densidade de espinhos dendríticos está diretamente relacionada com a diminuição do comportamento sexual observada anteriormente nesses animais (51).

FIGURA 1

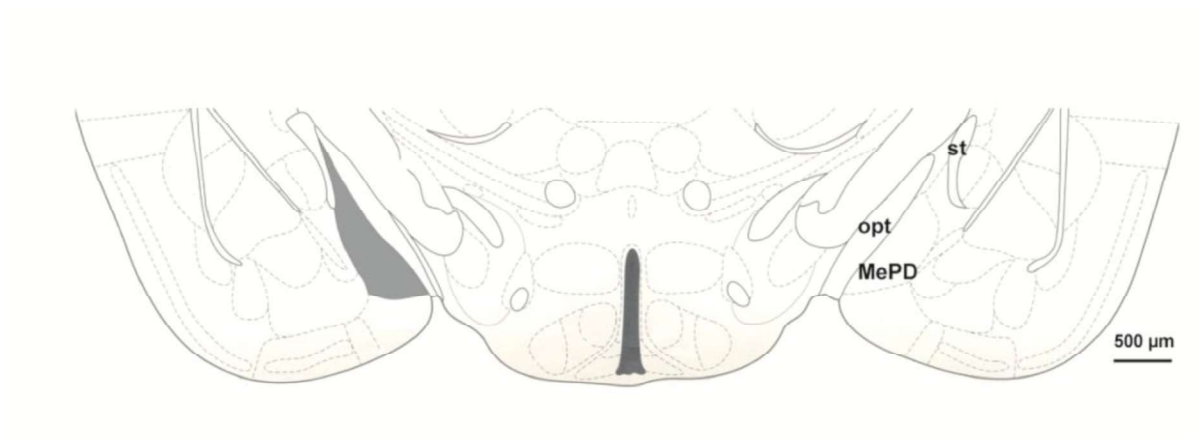


Figura 1: Diagrama esquemático da porção ventral de uma secção coronal que mostra a amígdala medial pósterodorsal (MePD) localizada no prosencéfalo do camundongo. Nesse caso, a MePD está localizada a uma distância posterior de 1,70 mm do bregma. A área preenchida de cinza indica a localização da MePD. MePV, amígdala medial pósterodorsal; opt, trato óptico; st, estria terminal. Escala = 500 µm. Adaptado do atlas de Franklin e Paxinos (162).

FIGURA 2

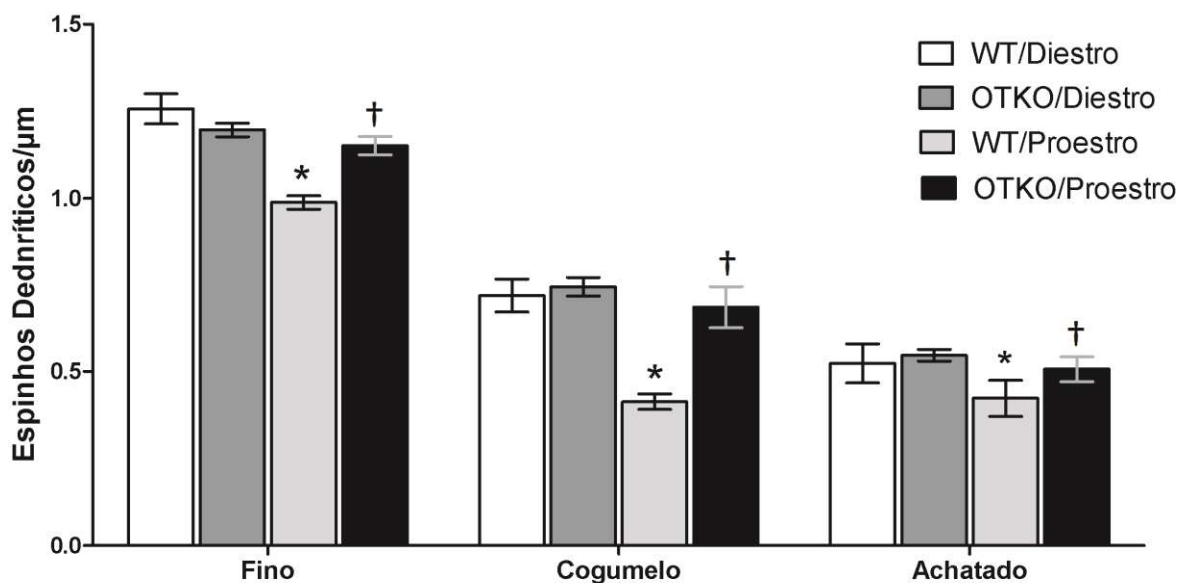


Figura 2: Média (\pm DP) da densidade de espinhos dendríticos das diferentes morfologias nos dendritos proximais dos neurônios da MePD de fêmeas WT e OTKO. * $P < 0.001$ quando comparado ao grupo WT/Diestro, † $P < 0.01$ quando comparado ao grupo WT/Proestro, $n = 6$ animais por grupo experimental.

4.2 Artigo 2: Selective deletion of the oxytocin gene remodels the number and shape of dendritic spines in the medial amygdala of males with and without sexual experience

Roberta Oriques Becker^a, Alberto A. Rasia-Filho^{b,1} and Márcia Giovenardi^{a,b,1}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Biociências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

¹ These authors contributed equally to the present study.

Revista Escolhida: Neuroscience Letters.

Fator de Impacto: 2.107.

Link para acesso on-line:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394017307322?via%3Dihub>

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.08.075>



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

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

Research paper

Selective deletion of the oxytocin gene remodels the number and shape of dendritic spines in the medial amygdala of males with and without sexual experience


 Roberta Oriques Becker^a, Alberto A. Rasia-Filho^{b,*}, Márcia Giovenardi^{a,b,*},¹
^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Posterodorsal medial amygdala

Spine structure

Dendritic spine density

Reproductive behavior

Neural plasticity

ABSTRACT

Oxytocin has central actions that modulate synaptic plasticity and the occurrence of social behavior in rodents. The posterodorsal medial amygdala (MePD) composes a sexually dimorphic neural circuit for the display of male sexual behavior. Local dendritic spines are notably plastic and affected by context-dependent social stimuli. Here, we examined the effects of the selective deletion of the OT gene (OTKO) in the number and shape of Golgi-impregnated dendritic spines in the MePD of naïve and sexually experienced (SexExp) male mice ($n = 6$ each group). Compared to the control wild-type mice (WT), OTKO naïve mice did not differ in the density of dendritic spines, but there was a significant and more intense reduction in the number of spines in the WT/SexExp ($\sim 40\%$) than in the OTKO/SexExp ($\sim 25\%$). This structural change had a spine-specific feature. That is, sexual experience induced a decrease in the number of thin ($\sim 50\%$) and mushroom-like spines ($\sim 35\%$) at the same time that increased ($\sim 30\%$) the number of stubby/wide spines. In addition, the OTKO/SexExp animals have more thin and mushroom spines than the WT/SexExp ones ($\sim 25\%$ and 55% , respectively; $p < 0.01$ in all cases). In conjunction, these novel data indicate that OT participates in the spine remodeling, synaptic refinement, and social stimuli-dependent plasticity in the MePD of male mice.

1. Introduction

The modulation of synaptic plasticity and the occurrence of social behaviors, including maternal care, affiliation, and sexual behavior, involve the oxytocinergic action in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST), the medial preoptic area (MPOA), the ventromedial hypothalamus (VMH), and the medial nucleus of the amygdala (MeA) in rodents [1–4]. Among these areas, the MeA forms part of the “extended amygdala” [5] and its sexually dimorphic posterodorsal subdivision (MePD) integrates olfactory and pheromonal stimuli [6,7] with neural gonadal hormone effects to control the reproductive behavior of male and female rats [reviewed in 8].

The density and shape of dendritic spines in the rat MePD can be affected by circulating levels of sex steroids or by experimental manipulations, such as castration and gonadal hormone replacement therapy [9,10]. For example, the density of proximal dendritic spines is higher in males than in females in proestrous, estrous or metaestrous [9]. Castration of adult males, irrespective of brain hemisphere,

decreased the dendritic spine density in the MePD, but induced different effects on each spine type studied [10]. I.e., compared to control groups, castration reduced the number of thin, mushroom-like, and ramified spines, but increased the number of stubby/wide ones [10]. These data are relevant because dendritic spines are specialized post-synaptic elements that receive most inputs from excitatory axons [11,12]. Spines can dynamically modulate synaptic strength and plasticity [13] and their shapes can be related with functional features. Thin spines with a narrow neck can impose a higher resistance for the voltage coupling of the spine with the parent dendrite [14], a finding that does not occur for stubby/wide spines [15]. Mushroom shaped spines have a large head and the head diameter is related with the extension of the postsynaptic density and the type of glutamatergic receptor to be activated [16].

It was recently reported that oxytocin (OT) is an important synaptic modulator in the MePD of mice [2,17]. The selective deletion of the OT gene in knockout mice (OTKO) decreased the display of female sexual behavior [17], a finding that also showed a selective involvement of the

* Corresponding authors at: Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, R. Sarmento Leite 245, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil.

E-mail addresses: aarf@ufcspa.edu.br, rasiafilho@pq.cnpq.br (A.A. Rasia-Filho), giovenardi.marcia@gmail.com (M. Giovenardi).

¹ These authors contributed equally to the present study.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2017.08.075>

Received 27 May 2017; Received in revised form 18 August 2017; Accepted 31 August 2017

Available online 06 September 2017

0304-3940/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

different types of dendritic spines in the MePD [2]. On the other hand, male mice lacking the OT gene did not exhibit an evident sexual behavior deficit [18,19]. This does not mean that OT is not important for the central modulation of this behavior. Microinjection of OT into the lateral ventricles stimulates copulation in male rats [20], an effect that can be blocked by the administration of an OT receptor (OTR) antagonist [20,21]. Oxytocin is one of the neuropeptides that control penile erection and sexual motivation [22]. Furthermore, sexual experience is associated with the increased OTR expression in the MPOA of male rats [23].

Interestingly, the MePD participates in the central control of penile erection [24], the initiation of copulatory behavior [25], and for experience-dependent changes in electrophysiological responses induced by a receptive female [26]. Because OT can modulate both the synaptic plasticity and reproductive behavior, we studied the effects of the selective deletion of the OT gene in the number and shape of dendritic spines in the MePD of male mice with and without sexual experience.

2. Material and methods

The animals were the offspring of a backcrossed stock from Dr. W. Scott Young (B6; 129S-Oxmt1Wsy/J; NIMH, USA; [cf.2,17]). All animals were littermates from heterozygous breeders (C57BL/6 mice). Genotyping was described in details elsewhere [17,27]. Adult males ($N = 24$), 5–8 months old and weighing 25–35 g, were housed in groups with free access to food and water. All subjects were maintained in a temperature-controlled room ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) on a 12:12 light–dark cycle with the lights off at 5 p.m. All procedures were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (8th edition, 2011) and approved by the local Ethics Committee (UFCSA, Brazil, protocol no. 920/09 and 130/13).

Males were randomly divided in 4 groups ($n = 6$ in each group): 2 groups of sexually naïve mice [wild-type (WT/Naïve) and OTKO (OTKO/Naïve)] and 2 groups of sexually experienced mice [WT (WT/SexExp) and OTKO (OTKO/SexExp)]. The animals that were sexually experienced were placed during 3 weeks with sexually receptive females, which became pregnant [adapted from 28].

At the end of this period, the mice of the four experimental groups were submitted to the Golgi method. The methodological procedure described here was previously employed by [2,17]. Briefly, males were deeply anesthetized with intraperitoneal injections of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), brains were perfused and fixed with 4% paraformaldehyde and 2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer solution ($\text{pH} = 7.4$), sectioned coronally (150- μm thick) using a Vibratome™ (Leica, Germany), immersed in 3% potassium dichromate and, afterwards, in 1.5% silver nitrate solutions (Merck, Germany). Sections were rinsed in distilled water, dehydrated in an ascending series of alcohols, cleared with xylene, mounted on slides, and covered with synthetic balsam and coverslips. Both hemispheres were studied.

The selected brain sections were approximately 1.46–1.94 mm

posterior to the bregma [29] where the MePD is edged laterally by the optic tract and the “molecular layer”, and ventrally by the stria terminalis [5]; Fig. 1). The including criteria for neuronal selection were: (a) be undoubtedly located within the boundaries of the MePD; (b) be relatively isolated from neighboring impregnated cells to avoid “tangled” dendrites; (c) dendrites should have well-impregnated and defined borders; and (d) spines should be clearly distinguishable from the background [17]. Neurons whose proximal dendrites fulfilled these above mentioned criteria had their spines drawn along 40 μm [based on 30] through the z-axis focal planes using a camera lucida (at 2000x; i.e., 100 x oil-immersion objective lens and 20 x ocular lens) coupled to an optic microscope (Olympus BX-41, Japan). For each male, 8 different dendrites (one per neuron) were studied per mouse. Spine density was defined as the number of spines per unit length of dendritic segment (in μm). Three-dimensional dendritic lengths were measured from the same microscopic images (400x; Olympus BX-61, Japan) after the selected dendrites had been captured by a high-resolution digital camera (CCD DP72, Japan) and measured using the Image Pro Plus 7.0 computer software (Media Cybernetics, USA).

The three differently shaped and most common dendritic spines in the MePD were identified and counted in the above mentioned experimental groups. The morphological features of the spine head and neck allowed spine classification as thin, mushroom or stubby/wide one [31]. The number of each type of spine was counted along the z-axis on the same dendritic segments evaluated for the density of spines.

Mean values were calculated for each animal. Data were tested for normal distribution and homodasticity using the Kolmogorov-Smirnov test and the Bartlett test, respectively. The overall density of spines was compared between groups by a two-way analysis of variance (ANOVA) test followed by the Bonferroni test. The number of each type of spine per experimental group was submitted to a one-way ANOVA and the Tukey post hoc test. The statistical level of significance was set as $P \leq 0.05$. We used the Prism statistical software (GraphPad, USA).

3. Results

Representative microscopic images of a long Golgi-impregnated spiny dendrites from the MePD and camera lucida drawings for the dendritic spines of each experimental group are shown in Fig. 2A and 2B, respectively. Minimum and maximum ranges (spines/dendritic μm) in the MePD were 1.77 – 2.10 (WT/Naïve), 2.00 – 2.12 (OTKO/Naïve), 0.92 – 1.35 (WT/SexExp), and 1.27 – 1.50 (OTKO/SexExp; Fig. 2C).

The density of dendritic spines in the MePD showed a statistically significant difference between groups due to the selective deletion of the OT gene [$F(1,20) = 23.70$, $P < 0.01$], sexual experience [$F(1,20) = 306.85$, $P < 0.01$] and the interaction of these two factors [$F(1,20) = 4.58$, $P = 0.04$]. The post hoc test showed that both sexually experienced groups had a significant decrease in the density of dendritic spines in the MePD than the naïve groups ($P < 0.01$). No difference was found between WT/Naïve and OTKO/Naïve mice ($P > 0.05$), but

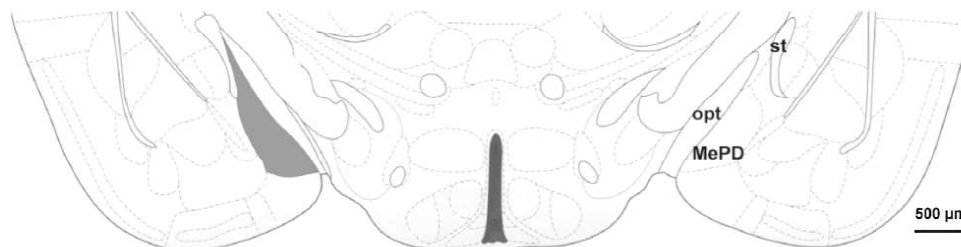


Fig. 1. Schematic diagram of the ventral part of a coronal slice showing the posterodorsal medial amygdala (MePD) in the mice forebrain and from where part of the present data was obtained (in this case, 1.70 mm posterior to the bregma). Gray filled area indicates the MePD location. MePV, posterovenral medial amygdala; opt, optic tract; st, stria terminalis. Scale bar = 500 μm . Adapted from the atlas of Franklin and Paxinos [29].

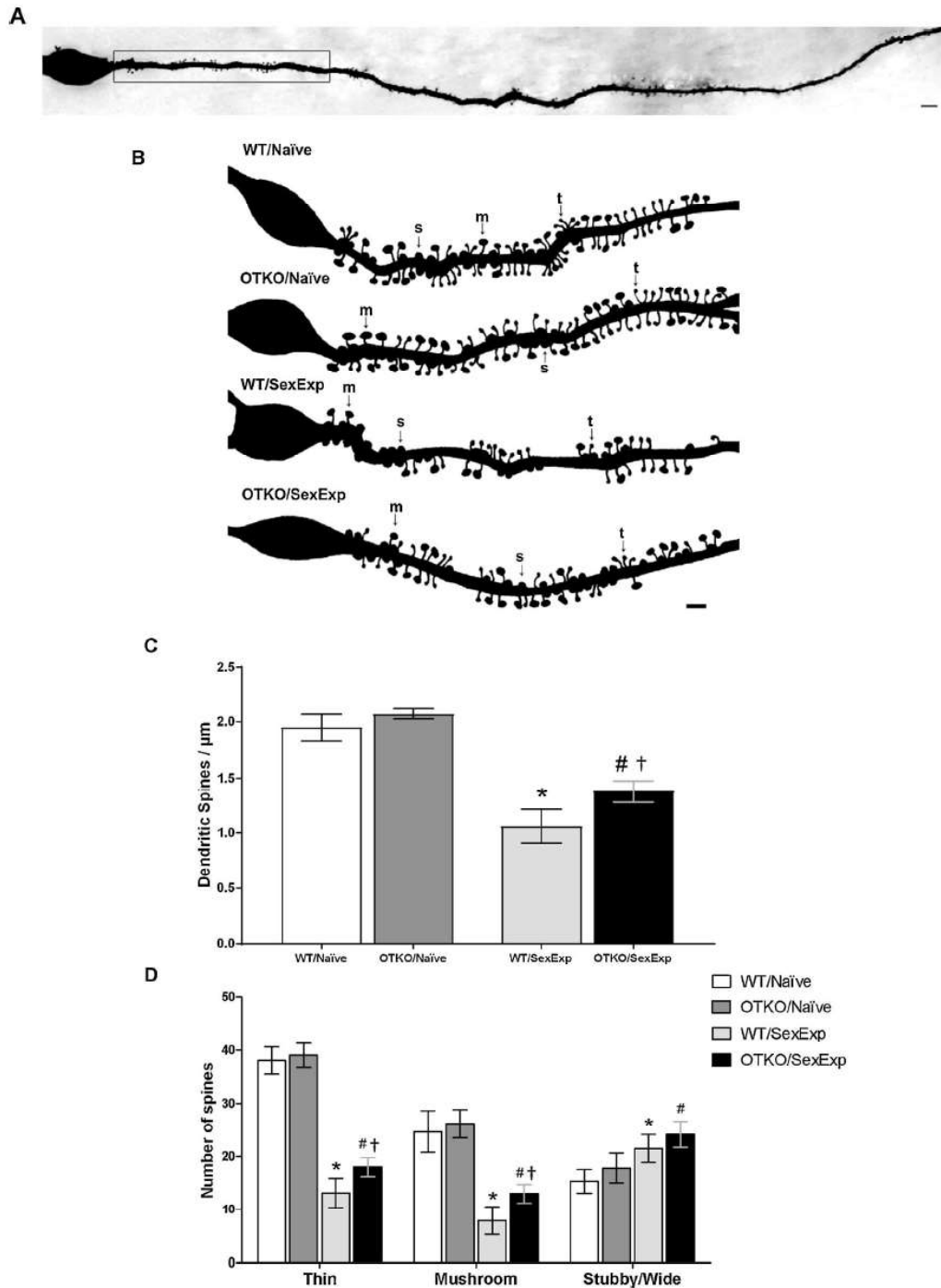


Fig. 2. (A) Reconstructed microscopic image of a representative Golgi-impregnated neuron from the male mice posterodorsal medial amygdala (MePD). Spines were studied along the proximal dendrite (40 μm , boxed area). Scale = 3 μm . (B) Camera lucida drawings of MePD spiny dendrites from the wild type naïve (WT/Naïve), oxytocin knockout naïve (OTKO/Naïve), WT sexually experience (WT/SexExp) and OTKO sexually experience (OTKO/SexExp) groups. Scale bar = 2 μm . Spine shapes were classified as thin (t), mushroom (m) or stubby/wide (s). (C) Values (mean \pm standard deviation) of the density of dendritic spines and (D) the number of different shaped dendritic spines in the MePD of experimental groups (n = 6 each) * P < 0.01 when compared to WT/Naïve, # P < 0.01 when compared to OTKO/Naïve, † P < 0.01 when compared to WT/SexExp.

OTKO/SexExp mice had a higher density of dendritic spines in the MePD than the WT/SexExp group ($P < 0.01$; Fig. 2C).

There was a statistically significant difference between groups in the number of thin [$F(3,20) = 190.50$, $P < 0.01$], mushroom [$F(3, 20) = 58.77$, $P < 0.01$] and stubby/wide spines [$F(3, 20) = 14.24$, $P < 0.01$]. The post hoc test showed that both WT/SexExp and OTKO/SexExp groups had a significant decrease in the number of thin and mushroom spines ($P < 0.01$). At the same time, there was a higher number of stubby/wide spines ($P < 0.01$) in these groups than in the WT/Naïve and OTKO/Naïve ones. In addition, the OTKO/Exp group showed a higher number of thin and mushroom spines than the WT/Exp one ($P < 0.01$; Fig. 2D).

4. Discussion

The present results provide the first evidence that the number and shape of dendritic spines can be modulated by the deletion of the OT gene and by sexual experience in the MePD of adult male mice. Our findings revealed that (1) WT and OTKO naïve mice did not differ in the density of dendritic spines, but sexual experience reduced ~25–40% the density of proximal dendritic spines in both WT and OTKO animals. This plastic change is not the same in OTKO and WT males. That is, the absence of the OT action in the MePD is related with the presence of more spines (~25% higher) in local neurons of OTKO animals than in its control group. (2) These effects in the MePD have a notable spine-specific feature. Sexual experience induced a decrease in the number of thin and mushroom-like spines (~35–50%) at the same time that increased the number of stubby/wide spines (~30%). In addition, the OTKO/SexExp animals have more thin and mushroom spines than the WT/SexExp ones (~25–55%). These data indicate that OT participates in the social stimuli-dependent structural plasticity and in the remodeling of dendritic spines in the male mice MePD.

In this sense, the posterior MeA modulates male sexual behavior by matching sexual experiences with the processing of the social context of encounters with females [25,26]. The electrical stimulation of the posterior MeA in male rats increased the frequency of mounting and investigative behavior directed toward a male conspecific. However, these effects were limited to naïve males, indicating that the effect of MeA stimulation can be modulated by previous sexual experience to regulate species-typical copulatory responses in males [26]. Experience-dependent neuronal changes also take place in the MeA of male hamsters [32]. That is, “exposure to an estrous female might produce long-term changes in the response properties of neurons within the MeA and its projection sites so that the processing of further stimulation that matches the previous (estrous female induced) pattern of neural activity... Indeed, previous exposure to chemical and tactile cues from an estrous female facilitates the transmission of subsequent matching chemosensory information within the vomeronasal-MeA-MPOA system”. Our present morphological findings support the first part of this proposition for male mice.

According to previous studies [18,19], the disruption of OT gene did not abolish male sexual behavior. Then, it is possible that both OT and the MePD are relevant parts, but not crucial ones, for the display of sexual behavior in mice. Nevertheless, OTKO mice showed deficit in social memory [33]. Pharmacological studies in OTKO mice have demonstrated that intracerebroventricular injections of OT into the MeA rescue social recognition, whereas injections of OT antagonist or OT receptor antisense oligonucleotide inhibits this behavior in WT mice [34–36]. After social exposure, OTKO mice exhibited reduced activity in the MeA, BNST, and MPOA and increased activity in the somatosensory cortex and hippocampus (CA1 and CA2 fields) detected by FOS immunoreactivity when compared to the WT mice. Therefore, these males may be using alternative neural pathways with other neurotransmitters and/or active neuropeptides or even from other receptive

It is also noteworthy that adult male rats display an increased preference for receptive females over nonreceptive females, probably due to the motivating properties of the female precopulatory cues emitted during estrus [38]. OT in the MeA is necessary for normal social recognition behavior in male mice [39]. Sexual behavior reflect the integration of olfactory and vomeronasal inputs in the anterior MeA and, afterwards, to the MePD [40] towards specific BNST and hypothalamic nuclei [41]. In the posterior MeA, blockage of OT actions disrupt the immediate early gene expression pattern for normal categorization of biologically relevant chemical-communication signals [39]. The synaptic processing in the MePD and the participation of OT in mice has two important features to be considered in naïve animals and in sexually experienced ones. In the former, the number and shape of dendritic spines is not different between WT and OTKO mice. A notable restructuring of synaptic connectivity and strength can be found in the MePD of WT/SexExp and OTKO/SexExp mice, with significant differences between these groups. In WT/SexExp mice it is likely that OT participated in the pruning of dendritic spines, but in OTKO/SexExp mice thin and mushroom spines did not decrease at the same extent following sexual experience.

Therefore, our data indicate a modulation in the number and structure of dendritic spines in the male MePD possibly involved with the afferent and local processing of the sensorial perception and the social meaning of a sexual encounter [39], mating and/or ejaculation [42]. Taking into account that the MePD is part of a sexually dimorphic circuit that modulates the occurrence of reproductive behavior [8,9], numerical and structural remodeling of dendritic spines have a considerable impact on the excitation of MePD neurons and their function in the male social behavior network. Both WT/SexExp and OTKO/SexExp have reduced the density of spines, but the lack of the OT gene and the altered oxytocinergic transmission promoted different effects in these spines compared to the WT control group. This addresses the relevance of the OT for the synaptic transmission and postsynaptic processing in the MePD. Spines receive mainly excitatory synapses and changes in the number and the shape of dendritic spines by the selective deletion of the OT gene can affect the neural connections that modulate the sexual behavior display in males. Because sexually experienced mice have a better performance than naïve ones, our data is suggestive of a synaptic refinement involving a selective reduction in thin and mushroom spines and an increase in stubby/wide ones in the MePD. Stubby/wide spines have a simple shape compared to the other classes. Nevertheless, they are relevant to quickly elaborate voltage changes to the parent dendrite and are more prone to provide a straight transmission of synaptic inputs towards the cell body [43]. This can be even more relevant for proximal dendritic spines, as studied here, to determine the firing rate and dynamic pattern of activity of MePD neurons. On the other hand, this does not dismiss the importance of thin and mushroom spines in the MePD. These are spines that can be involved with ‘learning’ and ‘memory’ functional properties, respectively, according the synaptic demands in each brain area [11]. Future studies using optogenetics, techniques using two-photon microscopy, and electrophysiological recordings can benefit and further elaborate the present findings and functional hypothesis.

In conclusion, the deletion of the OT gene remodels the number and selectively affects the shape of dendritic spines in the MePD of mice, a finding that involves the processing of social stimuli and memory elaboration as evidenced by differences in males with and without sexual experience. Also, these data from males add to those previously published data for OTKO female mice [2,17] to reveal the connective and functional roles of OT in a sexually dimorphic circuit that modulates social/reproductive behavior in mice and other mammals.

Conflict of interest

References

- [1] R. Stoop, Neuromodulation by oxytocin and vasopressin in the central nervous system as a basis for their rapid behavioral effects, *Curr. Opin. Neurobiol.* 29 (2014) 187–193.
- [2] R.O. Becker, A. Dall'Oglio, K. Rigatto, M. Giovanardi, A.A. Rasia-Filho, Differently shaped spines increase in the posterodorsal medial amygdala of oxytocin knockout female mice, *Neurosci. Res.* 101 (2015) 53–56.
- [3] H.K. Caldwell, E.A. Avulino, A.R. Freeman, T.V. Miller, S.K. Witchey, Oxytocin and behavior: Lessons from knockout mice, *Dev. Neurobiol.* 2 (2016) 190–201.
- [4] B.J. Marlin, R.C. Froemke, Oxytocin modulation of neural circuits for social behavior, *Dev. Neurobiol.* 77 (2016) 169–189.
- [5] J. de Olmos, C.A. Beltramino, G.F. Alheid, Amygdala and extended amygdala of the rat: cytoarchitectural, fibroarchitectural and chemoarchitectural survey, *The Rat Nervous System 1* Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004, pp. 509–603.
- [6] P. A. Brennan, F. Zufall, Pheromonal communication in vertebrates, *Nature* 444 (2006) 308–315.
- [7] D.W. Wacker, M. Ludwig, Vasopressin oxytocin, and social odor recognition, *Horm. Behav.* 61 (2012) 259–265.
- [8] A.A. Rasia-Filho, D. Haas, A.P. de Oliveira, J. de Castilhos, R. Frey, D. Stein, V.M. Lazzari, F. Back, G.N. Pires, E. Pavesi, E.C. Winkelmann-Duarte, M. Giovanardi, Morphological and functional features of the sex steroid-responsive posterodorsal medial amygdala of adult rats, *Mini Rev. Med. Chem.* 12 (2012) 1090–1106.
- [9] A.A. Rasia-Filho, F. Dalpian, I.C. Menezes, J. Brusco, J.E. Moreira, R.S. Cohen, Dendritic spines of the medial amygdala: plasticity, density, shape, and subcellular modulation by sex steroids, *Histol. Histopathol.* 27 (2012) 985–1011.
- [10] M. Zancan, A. Dall'Oglio, E. Quagliotto, A.A. Rasia-Filho, Castration alters the number and structure of dendritic spines in the male posterodorsal medial amygdala, *Eur. J. Neurosci.* 45 (2016) 572–580.
- [11] J. Boume, K.M. Harris, Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr. Opin. Neurobiol.* 17 (2007) 381–386.
- [12] N.L. Rochefort, A. Konnerth, Dendritic spines: from structure to in vivo function, *EMBO Rep.* 13 (2012) 699–708.
- [13] N. Spruston, M. Häusser, G. Stuart, Information processing in dendrites and spines, in: L.R. Squire, D. Berg, F.E. Bloom, S. du Lac, A. Ghosh, N.C. Spitzer (Eds.), *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, Waltham, 2013, pp. 231–260.
- [14] J. Tønnesen, U.V. Nägerl, Dendritic spines as tunable regulators of synaptic signals, *Front. Psychiatry* 7 (2016).
- [15] M. Segal, Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability, *Eur. J. Neurosci.* 31 (2010) 2178–2184.
- [16] R. Yuste, Electrical compartmentalization in dendritic spines, *Ann. Ver Neurosci.* 36 (2013) 429–449.
- [17] R.O. Becker, V.M. Lazzari, I.C. Menezes, M. Morris, K. Rigatto, A.B. Lucion, A.A. Rasia-Filho, M. Giovanardi, Sexual behavior and dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons in oxytocin knockout female mice, *Behav. Brain Res.* 256 (2013) 95–100.
- [18] K. Nishimori, L.J. Young, Q. Guo, Z. Wang, T.R. Insel, M.M. Matzuk, Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 11699–11704.
- [19] V.M. Lazzari, R.O. Becker, M.S. de Azevedo, M. Morris, K. Rigatto, S. Almeida, A.B. Lucion, M. Giovanardi, Oxytocin modulates social interaction but is not essential for sexual behavior in male mice, *Behav. Brain Res.* 244 (2013) 130–136.
- [20] H. Putagami, Y. Sakuma, Y. Kondo, Oxytocin mediates copulation-induced hypoalgesia of male rats, *Neurosci. Lett.* 618 (2016) 122–126.
- [21] R. Arletti, A. Benelli, A. Bertolini, Oxytocin involvement in male and female sexual behavior, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 12 (1992) 180–193.
- [22] M.R. Melis, A. Argiolas, Central control of penile erection: a re-visitation of the role of oxytocin and its interaction with dopamine and glutamic acid in male rats, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35 (2011) 939–955.
- [23] M. Gil, R. Bhatt, K.B. Picotte, E.M. Hull, Sexual experience increases oxytocin receptor gene expression and protein in the medial preoptic area of the male rat, *Psychoneuroendocrinology* 38 (2013) 1688–1697.
- [24] Y. Kondo, B.D. Sachs, Disparate effects of small medial amygdala lesions on non-contact erection, copulation, and partner preference, *Physiol. Behav.* 76 (2002) 443–447.
- [25] A. Petrucci, Frontiers in Neuroendocrinology Chemosignals and hormones in the neural control of mammalian sexual behavior, *Front. Neuroendocrinol.* 34 (2013) 255–267.
- [26] C.P. Stark, Behavioral effects of stimulation of the medial amygdala in the male rat are modified by prior sexual experience, *J. Gen. Psychol.* 132 (2005) 207–224.
- [27] J.M. Zimmernann-Peruzatto, V.M. Lazzari, G. Agnes, R.O. Becker, A.C. de Moura, R.P. Guedes, A.B. Lucion, S. Almeida, M. Giovanardi, The impact of oxytocin gene knockout on sexual behavior and gene expression related to neuroendocrine systems in the brain of female mice, *Cell. Mol. Neurobiol.* 37 (2016) 803–815.
- [28] W.T. Swaney, B.N. Dubose, J.P. Curley, F.A. Champagne, Sexual experience affects reproductive behavior and preoptic androgen receptors in male mice, *Horm. Behav.* 61 (2012) 472–478.
- [29] G. Paxinos, K. Franklin, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, fourth ed., Academic Press, 2012.
- [30] J. de Castilhos, S. Marcuzzo, C.D. Forti, R.M. Frey, D. Stein, M. Achaval, A.A. Rasia-Filho, Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: Dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior, *Brain Res. Bull.* 69 (2006) 131–139.
- [31] J. Brusco, A. Dall'Oglio, L.B. Rocha, M.A. Rossi, J.E. Moreira, A.A. Rasia-Filho, Descriptive findings on the morphology of dendritic spines in the rat medial amygdala, *Neurosci. Lett.* 483 (2010) 152–156.
- [32] G.D. Fewell, M. Meredith, Experience facilitates vomeronasal and olfactory influence on Fos expression in medial preoptic area during pheromone exposure or mating in male hamsters, *Brain Res.* 941 (2002) 91–106.
- [33] J.N. Ferguson, L.J. Young, E.F. Hearn, M.M. Matzuk, T.R. Insel, J.T. Winslow, Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene, *Nat. Genet.* 25 (2000) 284–288.
- [34] E. Choleris, J.A. Gustafsson, K.S. Korach, L.J. Muglia, D.W. Pfaff, S. Ogawa, An estrogen-dependent four-gene micronet regulating social recognition: a study with oxytocin and estrogen receptor – alpha and – beta knockout mice, *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 100 (2003) 6192–6197.
- [35] J.N. Ferguson, J.M. Aldag, T.R. Insel, L.J. Young, Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse, *J. Neurosci.* 21 (2001) 8278–8285.
- [36] M. Kavaliers, A. Agmo, E. Choleris, Gustafsson J.Å, K.S. Korach, L.J. Muglia, D.W. Pfaff, S. Ogawa, Oxytocin and estrogen receptor alpha and beta knockout mice provide discriminably different odor cues in behavioral assays, *Genes, Brain Behav.* 3 (2004) 189–195.
- [37] J.T. Winslow, T.R. Insel, The social deficits of the oxytocin knockout mouse, *Neuropeptides* 36 (2002) 221–229.
- [38] M. Hernández-González, M.A. Guevara, Motivational influences on the degree and direction of sexual attraction, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 87 (2008) 61–87.
- [39] C.L. Samuelsen, M. Meredith, Oxytocin antagonist disrupts male mouse medial amygdala response to chemical-communication signals, *Neuroscience* 180 (2011) 96–104.
- [40] M. Meredith, J.M. Westberry, Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones, *J. Neurosci.* 24 (2004) 5719–5725.
- [41] H. Choi, A.J. Murphy, D.M. Valenzuela, G.D. Yancopoulos, L.W. Swanson, D.J. Anderson, Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus, *Neuron* 46 (2005) 647–660.
- [42] M.L. Coolen, H.J. Peters, J.G. Veening, Distribution of Fos immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain, *Neuroscience* 77 (1997) 1151–1161.
- [43] M. Ivenshitz, M. Segal, Neuronal density determines network connectivity and spontaneous activity in cultured hippocampus, *J. Neurophysiol.* 104 (2010) 1052–1060.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Os circuitos neurais apresentam elevada plasticidade, de forma que mudam em resposta aos estímulos sensoriais e as interações ambientais. Essa plasticidade está relacionada com a liberação de diversos neuromoduladores. A OT está relacionada com a modulação de uma série de comportamentos sociais, inclusive com resultados que apresentam aplicabilidade clínica (10,12,14,15).

Nossos achados reforçam a ideia que a OT promove mudanças dinâmicas na densidade de espinhos dendríticos na MePD ao longo do ciclo estral, uma vez que, nos camundongos OTKO em proestro uma maior densidade ou uma não redução da densidade de espinhos dendríticos está diretamente relacionada com a diminuição do comportamento sexual observada anteriormente nesses animais (51).

Já nos machos, os grupos WT e OTKO sem experiência sexual não apresentaram diferenças significativas em relação à densidade de espinhos dendríticos nos neurônios da MePD. Entretanto, a experiência sexual promoveu uma redução significativa da densidade de espinhos em ambos os grupos estudados. Essa redução apresenta características espinho-específicas, uma vez que, a experiência sexual induziu uma diminuição no número de espinhos dos tipos fino e cogumelo, mas ao mesmo tempo, um aumento no número de espinhos do tipo achatado. Além disso, entre os grupos com experiência sexual, o grupo OTKO apresentou uma maior quantidade de espinhos dos tipos fino e cogumelo, quando comparado ao grupo WT. Portanto, esses dados indicam que OT participa da plasticidade estrutural dependente de estímulos sociais e da remodelação de espinhos dendríticos na MePD de machos.

Em conclusão, a deleção do gene OT remodela a quantidade e afeta seletivamente a morfologia dos espinhos dendríticos na MePD de fêmeas durante o proestro e de machos com experiência sexual. Dessa forma, os resultados deste estudo somados aos dados publicados anteriormente, permitem desvendar os papéis conectivos e funcionais da OT no circuito sexualmente dimórfico que modula o comportamento sexual em roedores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barbey AK, Krueger F, Grafman J. An evolutionarily adaptive neural architecture for social reasoning. *Trends Neurosci.* 2009;32(12):603–10.
2. Duckworth RA. The role of behavior in evolution : a search for mechanism. *Evol Ecol.* 2009;23:513–31.
3. Insel TR, Fernald RD. How the brain processes social information: Searching for the Social Brain. *Annu Rev Neurosci.* 2004;27(1):697–722.
4. Choleris E, Clipperton-Allen AE, Phan A, Kavaliers M. Neuroendocrinology of social information processing in rats and mice. *Front Neuroendocrinol.* 2009;30(4):442–59.
5. Sweatt JD. Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances. *J Neurochem.* 2016;139(2):179–99.
6. Keverne EB. Understanding well-being in the evolutionary context of brain development. *Phil Trans R Soc Lond B.* 2004;359:1349–58.
7. Lee HJ, Macbeth AH, Pagani JH, Scott Young W. Oxytocin: The great facilitator of life. *Prog Neurobiol.* 2009;88(2):127–51.
8. Chang SWC, Brent LJM, Adams GK, Klein JT, Pearson JM. Neuroethology of primate social behavior. *PNAS.* 2013;110(2):10387–94.
9. Marlin BJ, Mitre M, D'amour JA, Chao M V, Froemke RC. Oxytocin enables maternal behaviour by balancing cortical inhibition. *Nature.* 2015;520:499–504.
10. Marlin BJ, Froemke RC. Oxytocin modulation of neural circuits for social behavior. *Dev Neurobiol.* 2017;77(2):169–89.
11. Becker RO, Dall'Oglio A, Rigatto K, Giovenardi M, Rasia-Filho AA. Differently shaped spines increase in the posterodorsal medial amygdala of oxytocin knockout female mice. *Neurosci Res.* 2015;101:53–6.
12. Caldwell HK, Aulino EA, Freeman AR, Miller T V., Witchev SK. Oxytocin and behavior: Lessons from knockout mice. *Dev Neurobiol.* 2017;77(2):190–201.
13. Stoop R. Neuromodulation by oxytocin and vasopressin in the central nervous system as a basis for their rapid behavioral effects. *Curr Opin Neurobiol.* 2014;29:187–93.
14. Caldwell HK. Oxytocin and Vasopressin : Powerful Regulators of Social Behavior. *Neurosci.* 2017;1–12.
15. Fineberg SK, Ross DA. Clinical Commentary Oxytocin and the Social Brain. *Biol Psychiatry.* 2017;81(3):19–21.
16. Johnson ZV, Young LJ. Neuroscience and Biobehavioral Reviews Oxytocin and vasopressin neural networks : Implications for social behavioral diversity and translational neuroscience. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017;76:87–98.

17. Landgraf R, Neumann ID. Vasopressin and oxytocin release within the brain : a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front Neuroendocr.* 2004;25:150–76.
18. Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H. Synthesis , Transport , and Release of Posterior Pituitary Hormones. *Science (80-)*. 1980;207(4429):373–8.
19. Sivukhina E V., Jirikowski GF . Magnocellular hypothalamic system and its interaction with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Steroids.* 2016;111:21–8.
20. Sofroniew M V . Morphology of Vasopressin and Oxytocin Neurones and Their Central and Vascular Projections. *Prog Brain Res.* 1983;60:101–14.
21. Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic Integration: Organization of the Paraventricular and Supraoptic Nuclei. *Annu Rev Neurosci.* 1983;6:269–324.
22. Gimpl G, Fahrenholz F, Griebel G. The Oxytocin Receptor System : Structure , Function , and Regulation. *Physiol Rev.* 2001;81(2):629–83.
23. Schafer FR, Mackenzie MB. The action of Animal Extracts on milk secretion. *R Soc.* 1911;84(568):16–22.
24. Park J, Willmott M, Vetuz G, Toye C, Kirley A, Hawi Z, et al. Evidence that genetic variation in the oxytocin receptor (OXTR) gene influences social cognition in ADHD. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2010;34(4):697–702.
25. Dale. On Some physiological Actions of Ergot. *J Physiol.* 1906;34(3):163–206.
26. Jenkins JS, Ang VTY, Hawthorn J, Rossor MN, Iversen LL. Vasopressin, oxytocin and neurophysins in the human brain and spinal cord. *Brain Res.* 1984;291(1):111–7.
27. Choe HK, Reed MD, Benavidez N, Soares N, Yim YS, Choi GB, et al. Oxytocin Mediates Entrainment of Sensory Stimuli to Social Cues of Opposing Valence Article Oxytocin Mediates Entrainment of Sensory Stimuli to Social Cues of Opposing Valence. *Neuron.* 2015;87(1):152–63.
28. Oettl LL, Ravi N, Schneider M, Scheller MF, Schneider P, Mitre M, et al. Oxytocin Enhances Social Recognition by Modulating Cortical Control of Early Olfactory Processing. *Neuron.* 2016;90(3):609–21.
29. Zheng DJ, Larsson B, Phelps SM, Ophir AG. Female alternative mating tactics, reproductive success and nonapeptide receptor expression in the social decision-making network. *Behav Brain Res.* 2013;246:139–47.
30. Pfaus JG, Kippin TE, Coria-Avila GA, Gelez H, Afonso VM, Ismail N, et al. Who, what, where, when (and maybe even why)? How the experience of sexual reward connects sexual desire, preference, and performance. *Arch Sex Behav.* 2012;41:31–62.
31. Kustritz MVR. Reproductive behavior of small animals. *Theriogenology.* 2005;64(3):734–46.

32. Pedersen CA, Boccia ML. Vasopressin interactions with oxytocin in the control of female sexual behavior. *Neuroscience*. 2006;139(3):843–51.
33. Nishimori K, Young LJ, Guo Q, Wang Z, Insel TR, Matzuk MM. Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(21):11699–704.
34. Leng G, Meddle SL, Douglas AJ. Oxytocin and the maternal brain. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8(6):731–4.
35. Giovenardi M, Padoin MJ, Cadore LP, Lucion AB. Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: Effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. *Physiol Behav*. 1998;63(3):351–9.
36. Engelmann M, Wotjak CT, Ebner K, Landgraf R. Behavioural impact of intraseptally released vasopressin and oxytocin in rats. *Exp Physiol*. 2000;85:125S–130S.
37. Lim MM, Young LJ. Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. *Horm Behav*. 2006;50(4):506–17.
38. Oliet SHR, Piet R. Anatomical Remodelling of the Supraoptic Nucleus : Changes in Synaptic and Extrasynaptic Transmission. *J Neuroendocrinol*. 2004;16:303–7.
39. Cunningham RL, Claiborne BJ, Mcginnis MY. Pubertal exposure to anabolic androgenic steroids increases spine densities on neurons in the limbic system of male rats. *Neuroscience*. 2010;150(3):609–15.
40. Panatier A, Gentles SJ, Bourque CW, Oliet SHR. Activity-dependent synaptic plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *J Physiol*. 2006;573:711–21.
41. Zingg HH, Laporte SA. The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14(5):222–7.
42. Bale TL, Davis AM, Auger AP, Dorsa DM, Mccarthy MM. CNS Region-Specific Oxytocin Receptor Expression : Importance in Regulation of Anxiety and Sex Behavior. *J Neurosci*. 2001;21(7):2546–52.
43. Mitre M, Marlin BJ, Schiavo JK, Morina E, Norden SE, Hackett TA, et al. A Distributed Network for Social Cognition Enriched for Oxytocin Receptors. *J Neurosci*. 2016;36(8):2517–35.
44. Insel TR, Gelhard R, Shapiro LE. The comparative distribution of forebrain receptors for neurohypophyseal peptides in monogamous and polygamous mice. *Neuroscience*. 1991;43(2–3):623–30.
45. Veinante P. Distribution of Oxytocin- and Vasopressin-Binding Sites in the Rat Extended Amygdala : A Histoautoradiographic Study. *J Comp Neurol*. 1997;325:305–25.
46. Ophir AG, Gessel A, Zheng D, Phelps SM. Hormones and Behavior Oxytocin receptor density is associated with male mating tactics and social monogamy.

- Horm Behav. 2012;61(3):445–53.
47. Manning M, Misicka A, Olma A, Bankowski K, Stoev S, Chini B, et al. Oxytocin and Vasopressin Agonists and Antagonists as Research Tools and Potential Therapeutics. *J Neuroendocrinol*. 2012;24(4):609–28.
 48. Samuelsen CL, Meredith M. Oxytocin antagonist disrupts male mouse medial amygdala response to chemical-communication signals. *Neuroscience*. 2011;180:96–104.
 49. Pedersen A, Tomaszycski ML. Oxytocin antagonist treatments alter the formation of pair relationships in zebra finches of both sexes. *Horm Behav*. 2012;62(2):113–9.
 50. Carter CS. Sex differences in oxytocin and vasopressin : Implications for autism spectrum disorders ? *Behav Brain Res* 176. 2007;176:170–86.
 51. Becker RO, Lazzari VM, Menezes IC, Morris M, Rigatto K, Lucion AB, et al. Sexual behavior and dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons in oxytocin knockout female mice. *Behav Brain Res*. 2013;256:95–100.
 52. Lazzari VM, Becker RO, de Azevedo MS, Morris M, Rigatto K, Almeida S, et al. Oxytocin modulates social interaction but is not essential for sexual behavior in male mice. *Behav Brain Res*. 2013;244:130–6.
 53. Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ. Oxytocin in the Medial Amygdala is Essential for Social Recognition in the Mouse. *J Neurosci*. 2001;21(20):8278–85.
 54. Ferguson JN, Young LJ, Insel TR. The neuroendocrine basis of social recognition. *Front Neuroendocrinol*. 2002;23(2):200–24.
 55. Ferguson JN, Young LJ, Hearn EF, Matzuk MM, Insel TR, Winslow JT. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet*. 2000;25(3):284–8.
 56. Winslow JT, Insel TR. The social deficits of the oxytocin knockout mouse. *Neuropeptides*. 2002;36(2–3):221–9.
 57. Bonthuis PJ, Cox KH, Searcy BT, Kumar P, Tobet S, Rissman EF. Of mice and rats: Key species variations in the sexual differentiation of brain and behavior. *Front Neuroendocrinol*. 2010;31(3):341–58.
 58. Argiolas A, Rosaria M. Progress in Neurobiology Neuropeptides and central control of sexual behaviour from the past to the present : A review. *Prog Neurobiol*. 2013;108:80–107.
 59. Angoa-pérez, M., Kuhn, D.M. 2015. Neuroanatomical dichotomy of sexual behaviors in rodents : a special emphasis on brain serotonin 595–606. *Behav Pharmacol*. 2015;26(6):595–606.
 60. Caligioni CS. Assessing Reproductive Status / Stages in Mice. *Anim Tech*. 2009;1–8.

61. Inyawilert W, Liao Y, Tang P. Superovulation at a specific stage of the estrous cycle determines the reproductive performance in mice. *Phytochem Lett.* 2016;16(4):279–86.
62. Edwards DA. Induction of Estrus in Female Mice : Estrogen-Progesterone Interactions. *Horm Behav.* 1970;304:299–304.
63. Johansen JA, Clemens LG, Nunez AA. Characterization of copulatory behavior in female mice: evidence for paced mating. *Physiol Behav.* 2008;95(3):425–9.
64. Caggiula AR, Herndon JG, Scanlon R, Greenstone D, Bradshaw W, Sharp D. Dissociation of active from immobility components of sexual behavior in female rats by central 6-hydroxy- dopamine: implications for ca involvement in sexual behavior and sensorimotor responsiveness. *Brain Res.* 1979;172:505–20.
65. Hull EM, Dominguez JM. Getting his act together: Roles of glutamate, nitric oxide, and dopamine in the medial preoptic area. *Brain Res.* 2006;1126(1):66–75.
66. Hernandez-González M, Guevara MA, Agmo Á. Motivational Influences on the Degree and. *Ann NY Acad Sci.* 2008;87:61–87.
67. Olivier B, Chan JSW, Snoeren EM, Olivier JDA, Veening JG, Vinkers CH, et al. Differences in Sexual Behaviour in Male and Female Rodents : Role of Serotonin. *Behav Neurosci.* 2011;15–36.
68. Drori D, Folman Y. Effects of cohabitation on the reproductive system , kidneys and body composition of male rats. 1964;8:351–9.
69. Thor DH, Flannelly KJ. Social-Olfactory Experience and Initiation of Copulation in the Virgin Male Rat I. *Physiol Behav.* 1977;19:411–7.
70. Lisk RD, Heimann J. The Effects of Sexual Experience and Frequency of Testing on Retention of Copulatory Behavior following Castration in the Male Hamster. *Behav Neural Biol.* 1980;171:156–71.
71. Pouille F, Scanziani M. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by feed-forward somatic inhibition. *Science (80-).* 2001;293(5532):325–31.
72. Robinson TE, Kent C. reviews The neural basis of drug craving : an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev.* 1993;8:247–91.
73. Keshavarzi S, Power JM, Albers EHH, Sullivan RKS, Sah P. Dendritic Organization of Olfactory Inputs to Medial Amygdala Neurons. *J Neurosci.* 2015;35(38):13020–8.
74. Fewell GD, Meredith M. Experience facilitates vomeronasal and olfactory influence on Fos expression in medial preoptic area during pheromone exposure or mating in male hamsters. *Brain Res.* 2002;941:91–106.
75. Martinez LA, Petrulic A. The medial preoptic area is necessary for sexual odor preference , but not sexual solicitation , in female Syrian hamsters. *Horm Behav.* 2013;63(4):606–14.

76. Wang F, Jun Z, Zhu H, Zhang Q, Lin Z, Hu H. Bidirectional Control of Social Hierarchy by Synaptic Efficacy in Medial Prefrontal Cortex. *Science* (80-). 2011;334(2011):693–7.
77. Varlinskaya EI, Spear LP. Social interactions in adolescent and adult Sprague-Dawley rats: Impact of social deprivation and test context familiarity. *Behav Brain Res*. 2008;188(2):398–405.
78. Yu G-Z, Kaba H, Okutani F, Takahashi S, Higuchi T, Seto K. The action of oxytocin originating in the hypothalamic paraventricular nucleus on mitral and granule cells in the rat main olfactory bulb. *Neuroscience*. 1996;72(4):1073–82.
79. Yu G-Z, Kaba H, Okutani F, Takahashi S, Higuchi T. The olfactory bulb: a critical site of action for oxytocin in the induction of maternal behaviour in the rat. *Neuroscience*. 1996;72(4):1083–8.
80. Broad KD, Curley JP, Keverne EB. Mother – infant bonding and the evolution of mammalian social relationships Email alerting service Mother – infant bonding and the evolution of mammalian social relationships. *Phil Trans R Soc B*. 2006;361:2199–214.
81. Knobloch HS, Charlet A, Hoffmann L, Eliava M, Khrulev S, Cetin A, et al. Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron*. 2012;73(3):553–66.
82. Alheid GF. Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;985:185–205.
83. Rasia-Filho AA, Londero RG, Achaval M. Effects of gonadal hormones on the morphology of neurons from the medial amygdaloid nucleus of rats. 1999;48(2):173–83.
84. De Olmos JS, Beltramino CA, Alheid G. Amygdala and Extended Amygdala of the Rat: A Cytoarchitectonical, Fibroarchitectonical, and Chemoarchitectonical Survey. *Rat Nerv Syst*. 2004;509–603.
85. Newman S. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. *Ann NY Acad Sci*. 1999;242–57.
86. Guillamón A, Segovia S. Sex Differences in the Vomeronasal System. *Brain Res Bull*. 1997;44(4):377–82.
87. Westberry JM, Meredith M. Distinctive Responses in the Medial Amygdala to Same-Species and Different-Species Pheromones. *J Neurosci*. 2004;24(25):5719–25.
88. Kondo Y, Arai Y. Functional association between the medial amygdala and the medial preoptic area in regulation of mating behavior in the male rat. *Physiol Behav*. 1995;57(1):69–73.
89. Dominguez JM, Hull EM. Stimulation of the medial amygdala enhances medial preoptic dopamine release : implications for male rat sexual behavior. *Brain Res*. 2001;917:225–9.

90. Coolen LM, Wood RI. Bidirectional Connections of the Medial Amygdaloid Nucleus in the Syrian Hamster Brain : Simultaneous Anterograde and Retrograde Tract. 1998;209:189–209.
91. Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of Projections From the Medial Nucleus of the Amygdala : A PHAL Study in the Rat. *J Comp Neurol*. 1995;360:213–45.
92. Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Rev* 38. 2001;38:247–89.
93. Lehman MN, Wlnans SS. Vomeronasal and Olfactory Pathways to the Amygdala Controlling Male Hamster Sexual Behavior : Autoradiographic and Behavioral Analyses. *Brain Res*. 1982;240:27–41.
94. Martinez LA, Petrulis A. The bed nucleus of the stria terminalis is critical for sexual solicitation , but not for opposite-sex odor preference , in female Syrian hamsters. *Horm Behav*. 2011;60(5):651–9.
95. Oberlander JG, Erskine MS. Receipt of vaginal – cervical stimulation modifies synapsin content in limbic areas of the female rat. *Neuroscience*. 2008;153:581–93.
96. Choi GB, Dong H, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Swanson LW, et al. Lhx6 Delineates a Pathway Mediating Innate Reproductive Behaviors from the Amygdala to the Hypothalamus. *Neuron*. 2005;46:647–60.
97. de Castilhos J, Forti CD, Achaval M, Rasia-Filho AA. Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: A Golgi study. *Brain Res*. 2008;1240:73–81.
98. Rasia-Filho AA, Haas D, de Oliveira AP, de Castilhos J, Frey R, Stein D, et al. Morphological and functional features of the sex steroid-responsive posterodorsal medial amygdala of adult rats. *Mini Rev Med Chem*. 2012;12(11):1090–106.
99. Rasia-Filho AA, Dalpian F, Menezes IC, Brusco J, Moreira JE, Cohen RS. Dendritic spines of the medial amygdala: Plasticity, density, shape, and subcellular modulation by sex steroids. *Histol Histopathol*. 2012;27(8):985–1011.
100. Polston EK, Heitz M, Barnes W, Cardamone K, Erskine MS. NMDA-Mediated Activation of the Medial Amygdala Initiates a Downstream Neuroendocrine Memory Responsible for Pseudopregnancy in the Female Rat. *J Neurosci*. 2001;21(11):4104–10.
101. Brusco J, Merlo S, Ikeda ÉT, Petralia RS, Kachar B, Rasia-Filho AA, et al. Inhibitory and multisynaptic spines, and hemispherical synaptic specialization in the posterodorsal medial amygdala of male and female rats. *J Comp Neurol*. 2014;522(9):2075–88.
102. Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. Distribution of Androgen

- and Estrogen Receptor mRNA-Containing Cells in the Rat Brain: An In Situ Hybridization Study. *J Comp Neurol.* 1990;95:76–95.
103. Hines M, Allen LS, Gorski RA. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res.* 1992;579:321–6.
 104. Cooke B, Tabibnia G, Breedlove M. A brain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:7538–40.
 105. Morris J, Jordan C, Marc B. Clustering, migration, and neurite formation of neural precursor cells in the adult rat hippocampus. *J Comp Neurol.* 2008;506:851–9.
 106. Johnson RT, Breedlove SM, Jordan CL. Sex Differences and Laterality in Astrocyte Number and Complexity in the Adult Rat Medial Amygdala. *J Comp Neurol.* 2008;511(5):599–609.
 107. Hermel EES, Ilha J, Xavier LL, Rasia-Filho AA, Achaval M. Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats. *Neurosci Lett.* 2006;405(1–2):153–8.
 108. Dall'Oglio A, Gehlen G, Achaval M, Rasia-Filho AA. Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: Further data based on the Golgi method. *Neurosci Lett.* 2008;430(2):151–6.
 109. Nishizuka M, Arai Y. Sexual dimorphism in synaptic organization in the amygdala and its dependence on neonatal hormone environment. *Brain Res.* 1981;212:31–8.
 110. Brusco J, Merlo S, Ikeda ÉT, Petralia RS, Kachar B. Inhibitory and Multisynaptic Spines, and Hemispherical Synaptic Specialization in the Posterodorsal Medial Amygdala of Male and Female Rats. *J Comp Neurol.* 2013;522(9):2075–88.
 111. Frankfurt M, Siegel RA, Sim I, Wuttke W. Cholecystokinin and Substance P Concentrations in Discrete Areas of the Rat Brain: Sex Differences. *Brain Res.* 1985;358:53–8.
 112. Gustafson EL, Card JP, Moore RY, G DNEL, Behavior RYM. Neuropeptide Y Localization in the Rat Amygdaloid Complex. *J Comp Neurol.* 1986;251:349–62.
 113. McDonald A. Coexistence of somatostatin with neuropeptide Y, but not with cholecystokinin or vasoactive intestinal peptide, in neurons of the rat amygdala. *Brain Res.* 1989;500:37–45.
 114. Marcos P, Coven R, Narva JA. Immunohistochemical mapping of enkephalins, NPY, CGRP, and GRP in the cat amygdala. 1999;20:635–44.
 115. Quagliotto E, Casali KR, Lago PD. Neuropeptides in the posterodorsal medial amygdala modulate central cardiovascular reflex responses in awake male rats. *Brazilian J Med Biol Res.* 2015;48:128–39.

116. Blake CB, Meredith M. Selective enhancement of main olfactory input to the medial amygdala by GnRH. *Brain Res.* 2009;1317:46–59.
117. Levy F, Kendrick KM, Goode JA, Guevara-guzman R, Keverne EB. Oxytocin and vasopressin release in the olfactory bulb of parturient ewes "changes with maternal experience and effects on acetylcholine , γ -aminobutyric acid , glutamate and noradrenaline release. *Brain Res* 669. 1995;669:197–206.
118. Brennan PA, Keverne EB. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Prog Neurobiol.* 1997;51:457–81.
119. Terenzi MG, Ingram CD. Oxytocin-induced excitation of neurones in the rat central and medial amygdaloid nuclei. *Neuroscience.* 2005;134:345–54.
120. Veinante P, Freund-Mercier MJ. Distribution of oxytocin- and vasopressin-binding sites in the rat extended amygdala: A histoautoradiographic study. *J Comp Neurol.* 1997;383(3):305–25.
121. Witt D. Oxytocin and rodent sociosexual responses: from behavior to gene expression. *Neurosci Biobehav Rev.* 1995;19(2):315–24.
122. Kow L, Pfaff DW. Mapping of neural and signal transduction pathways for lordosis in the search for estrogen actions on the central nervous system. *Behav Brain Res.* 1998;92:169–80.
123. Martinez-garcia F, Moncho-bogani J, Lanuza E, Jose M. Attraction to male pheromones and sexual behaviour show different regulatory mechanisms in female mice. *Physiol Behav.* 2004;81:427–34.
124. Griffin GD, Ferri-Kolwicz SL, Reyes BAS, Van Bockstaele EJ, Flanagan-Cato LM. Ovarian hormone-induced reorganization of oxytocin-labeled dendrites and synapses lateral to the hypothalamic ventromedial nucleus in female rats. *J Comp Neurol.* 2010;518(22):4531–45.
125. Molenda-Figueira HA, Williams CA, Griffin AL, Rutledge EM, Blaustein JD, Tettel MJ. Nuclear receptor coactivators function in estrogen receptor- and progesterin receptor-dependent aspects of sexual behavior in female rats. *Horm Behav.* 2006;50(3):383–92.
126. Arletti R, Benelli A, Bertolini A. Oxytocin involvement in male and female sexual behavior. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;12:180–93.
127. Bale TL, Dorsa DM. Cloning , Novel Promoter Sequence , and Estrogen Regulation of a Rat Oxytocin Receptor Gene. *Endocrinology.* 2014;138(3):1151–8.
128. Ostrowski NL. Oxytocin receptor mRNA expression in rat brain : implications for behavioral integration and reproductive success. *Psychoneuroendocrinology.* 1998;23(8):989–1004.
129. Kondo. Role of Septum and Preoptic Area in Regulating Masculine and Feminine Sexual Behavior in Male Rats. *Hormones.* 1990;24:421–34.
130. Burns-Cusato M, Scordalakes EM, Rissman EF. Of mice and missing data :

- what we know (and need to learn) about male sexual behavior. *Physiol Behav.* 2004;83:217–32.
131. Paredes G, Portillo W, Basanez E. Permanent changes in sexual behavior induced by medial preoptic area kindling-like stimulation. *Brain Res.* 2003;961:10–4.
 132. Carmichael MS, Humbert R, Dixen J, Palmisano G, Greenleaf W, Davidson JM, et al. Plasma Oxytocin Increases in the Human Sexual Response. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;64(1):27–31.
 133. Antonio Argiolas, Maria Rosarla Mehs LV and GLG. d(CH₂) 5Tyr(Me)-[Orn⁸] vasotocin , a potent oxytocin antagonist, antagonizes penile erection and yawning induced by oxytocin and apomorphine , but not by ACTH-(1-24). *Eur J Pharmacol.* 1987;134:221–4.
 134. Mahler S V., Berridge KC. What and when to “want”? Amygdala-based focusing of incentive salience upon sugar and sex. *Psychopharmacology (Berl).* 2012;221(3):407–26.
 135. Melis MR, Argiolas A. Central control of penile erection: A re-visitation of the role of oxytocin and its interaction with dopamine and glutamic acid in male rats. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011;35(3):939–55.
 136. Arletti R, Bazzani C, Castelli M, Bertolini A. Oxytocin Improves Male Copulatory Performance in Rats. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;19:14–20.
 137. Dall’Oglio A, Ferme D, Brusco J, Moreira JE, Rasia-Filho AA. The “single-section” Golgi method adapted for formalin-fixed human brain and light microscopy. *J Neurosci Methods.* 2010;189(1):51–5.
 138. Dall’Oglio A, Gehlen G, Achaval M, Rasia-Filho AA. Dendritic branching features of Golgi-impregnated neurons from the “ventral” medial amygdala subnuclei of adult male and female rats. *Neurosci Lett.* 2008;439(3):287–92.
 139. McDonald AJ. Cytoarchitecture of the Central Amygdaloid Nucleus of the Rat. *J Comp Neurol.* 1982;418:401–18.
 140. Rasia-Filho AA, Fabian C, Rigoti KM, Achaval M. Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience.* 2004;126(4):839–47.
 141. Cooke BM, Woolley CS. Sexually Dimorphic Synaptic Organization of the Medial Amygdala. *J Neurosci.* 2005;25(46):10759–67.
 142. Rochefort NL, Konnerth A. Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Rep.* 2012;13(8):699–708.
 143. Lai KO, Ip NY. Structural plasticity of dendritic spines: The underlying mechanisms and its dysregulation in brain disorders. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2013;1832(12):2257–63.
 144. Harris KM. Dendritic spines : cellular specializations. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17:341–71.

145. Fortin DA, Srivastava T, Soderling TR. Structural Modulation of Dendritic Spines during Synaptic Plasticity. *Neurosci.* 2012;18(4):326–41.
146. Woolf NJ. A structural basis for memory storage in mammals. *Prog Neurobiol.* 1998;55(1):59–77.
147. Harris M, Jensen F, Tsao B. Three-Dimensional Structure of Dendritic Spines and Synapses Rat Hippocampus (CA1) at Postnatal Day 15 and Adult Ages : Implications for the Maturation of Synaptic Physiology and Long-term Potentiation. *J Neurosci.* 1992;12(7):2685–705.
148. Popov VI, Deev AA, Klimenko OA, Kraev I V, Kuz SB, Medvedev NI, et al. Three-Dimensional Reconstruction of Synapses and Dendritic Spines in the Rat and Ground Squirrel Hippocampus : New Structural-Functional Paradigms for Synaptic Function. *Neurosci Behav Physiol.* 2005;35(4):333–41.
149. Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol.* 2002;64(313):353.
150. Segal M. Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival : activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability. *Eur J Neurosci.* 2010;31:2178–84.
151. Steward O, Schuman EM. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:299–325.
152. Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O’Shea DJ, et al. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature.* 2011;477(7363):171–8.
153. Yuste R. Electrical Compartmentalization in Dendritic Spines. *Annu Rev Neurosci.* 2013;429–49.
154. Qiao H, Li MX, Xu C, Chen H Bin, An SC, Ma XM. Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. *Neural Plast.* 2016;2016:20–4.
155. Ethell IM, Pasquale EB. Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol.* 2005;75:161–205.
156. Matus A. Growth of dendritic spines: a continuing story. *Curr Opin Neurobiol.* 2005;15:67–72.
157. Simon CM, Hepburn I, Chen W, De Schutter E. The role of dendritic spine morphology in the compartmentalization and delivery of surface receptors. *J Comput Neurosci.* 2014;36(3):483–97.
158. Wellman CL. Visualizing Changes in Neuronal Dendritic Morphology in Response to Stress and Pharmacological Challenge. *Curr Protoc Neurosci.* 2017;78:8.38.1-8.38.18.
159. Bourne J, Harris KM. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol.* 2007;17(3):381–6.

160. Petrak LJ, Harris KM, Kirov SA. Synaptogenesis on Mature Hippocampal Dendrites Occurs via Filopodia and Immature Spines during Blocked Synaptic Transmission. 2005;484:183–90.
161. Bailey CH, Kandel ER, Harris KM. Structural Components of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015;7:1–30.
162. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th Edition, 2012.

6. ANEXO 1: PARECERES DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Estudo do papel da ocitocina no comportamento sexual e reprodutivo de camundongos.		
Pesquisador Responsável Marcia Giovenardi		Parecer 920/09
Data da Versão 13/07/2009	Cadastro 506/09	Data do Parecer 13/08/2009
Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais		
<p>Objetivos do Projeto</p> <p>- Geral: Estudar o papel da ocitocina (OT) na regulação do comportamento sexual e reprodutivo de camundongos machos e fêmeas.</p> <p>Específicos: Analisar o efeito do deficit de ocitocina no comportamento sexual de camundongos fêmeas e machos;</p> <p>Analisar as concentrações plasmáticas dos hormônios progesterona, estradiol, luteinizante, folículo estimulante e prolactina, em machos e fêmeas knockout para ocitocina;</p> <p>Avaliar o número de oócitos presentes nos ovidutos das fêmeas, bem como a espermatogênese em machos de camundongos knockout para ocitocina;</p> <p>Estudar o comportamento de memória social e interação social em machos com deficit de ocitocina.</p>		
<p>Sumário do Projeto</p> <p>Em mamíferos, a OT tem importante papel na reprodução de fêmeas e na modulação de diversos comportamentos como interação social, comportamento sexual, maternal, agressivo maternal. Sabe-se que diferentes vias de transdução de sinais regulam a expressão dos receptores de OT e o binding em cada região cerebral e podem, em parte, mediar a habilidade da OT em exercer seus efeitos comportamentais. A OT facilita a motivação social e o comportamento de aproximação e, também, parece ser fundamental em processos de memória social na discriminação de indivíduos familiares ou não.</p>		

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os Itens de Identificação
Os experimentos serão realizados nos laboratórios de fisiologia e de fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica, UFSCPA.

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Comentário
-----------	------------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 78 Local Lab
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco-benefício	Não se aplica

Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Não se aplica
Avaliação dos dados	Adequada - qualitativa
Privacidade e confidencialidade	Não se aplica
Termo de Consentimento	Não se aplica
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os Itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	09/09
Data de término prevista	12/11
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Agência de fomento

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

O projeto será submetido a agências de fomento além de recursos que o pesquisador responsável já possui.

Referências Bibliográficas	Adequadas
----------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº:131/13 Parecer 270/14

2) DATA DO PARECER: 14/05/14

3) TÍTULO DO PROJETO:

Morfologia e densidade de espinhos dendríticos na amígdala medial póstero-dorsal de camundongos Knockout para o gene da ocitocina e sua relação com o comportamento sexual.

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Márcia Giovenardi

5) RESUMO DO PROJETO:

A sobrevivência das espécies depende do seu sucesso reprodutivo, sendo que a reprodução depende de vários circuitos integrados. A ocitocina exerce papel crucial neste comportamento, sendo que grande parte dos seus receptores estão situados no SNC..

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Investigar o papel da ocitocina na morfologia e densidade dos espinhos dendríticos proximais dos neurônios da amígdala medial póstero-dorsal, subnúcleo da amígdala responsável pelo processamento feromonal e pela reprodução, de camundongos com deleções seletivas no gene da OT (OTKO) e sua relação com o comportamento sexual.

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título Adequado Comentários

Introdução Adequada Comentários

Objetivos Adequados Comentários



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Relevância e Justificativa Adequados Comentários

Materiais e Métodos Adequados Comentários

Cronograma para execução da pesquisa Adequado Comentários

Orçamento e fonte financiadora Adequados Comentários

Referências Bibliográficas Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B C D E

Justifique:

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral: Sim Não

Justifique:

Substituição de Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Laboratório): UFCSPA – Sala 306 (Preparo de aulas práticas)
+ Laboratório de Fisiologia (Anexo II)

Outra instituição. Qual? UFCSPA

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
11/2013 a nov/2014	Camundongos	M e F	20 e 40

12) RECOMENDAÇÃO:

Aprovado

Com Pendência

Não aprovado



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Comentários gerais sobre o projeto:

Projeto aprovado pela UFCSPA, PORÉM OS ANIMAIS NÃO PODEM SER ALOJADOS NOS BIOTÉRIOS DA UFCSPA! A INSTITUIÇÃO NÃO TEM CREDENCIAMENTO JUNTO A CTNBIO. OS ANIMAIS DEVEM SER MANTIDOS NO HCPA, CONFORME INFORMADO PELO PESQUISADOR RESPONSÁVEL.

