



**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

**Comportamento sexual e expressão gênica de receptores em
áreas encefálicas de fêmeas nocaute para o gene da
ocitocina**

Tese de Doutorado

JOSI MARIA ZIMMERMANN-PERUZATTO

PORTO ALEGRE, 2015



**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

Comportamento sexual e expressão gênica de receptores em áreas encefálicas de fêmeas nocaute para o gene da ocitocina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Fisiologia.

JOSI MARIA ZIMMERMANN-PERUZATTO

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Márcia Giovenardi
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Silvana de Almeida**

PORTO ALEGRE, 2015

*“O trabalho tem uma dimensão que
vai além da produção de riquezas.
é o processo de humanização da
pessoa e do mundo.”*

Autor desconhecido

*Dedico este trabalho aos meus amores
Murillo, Marcelo, mãe e pai.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus** agradeço pela vida, saúde e paz de espírito.

À **Márcia** não há palavras para agradecer toda a dedicação que tivestes para comigo nesses anos de trabalho! Tu és uma orientadora que incentiva os seus alunos e que está sempre disponível a ajudar. Nesse espaço, quero deixar registrado que tenho profunda admiração pela profissional competente que tu és. Tu és um exemplo a ser seguido e me sinto muito feliz por ter recebido o privilégio de ter sido tua orientanda. À **Silvana** agradeço muito pelos conhecimentos de Biologia Molecular. Uma co-orientadora muito especial, com contribuições ricas que foram cruciais para o desenvolvimento dessa tese. A vocês obrigada pela excelente orientação!

À equipe do **Laboratório de Biologia Molecular** obrigada pelas inúmeras vezes que recebi ajuda nos trabalhos do doutorado e principalmente pelas amigas que aí conquistei. Em especial, destaco grandes amigas, parceiras e colegas de trabalho:

- **Virgínia Lazzari**, obrigada do fundo do meu coração pela parceria nesse trabalho. Eu reconheço e agradeço pela tua ajuda em todas as etapas desse trabalho. Desde as primeiras planilha, coleta de amostras, extração de RNAm, o RT-PCR e pela valiosa ajuda nas análises estatísticas. Quero também deixar registrado aqui, que tenho profunda admiração pela profissional competente que és e pela doce amiga que conquistei.

- **Roberta Becker**, obrigada pela ajuda ímpar com os nossos camundongos, pelas contribuições nas análises comportamentais e pelos inúmeros artigos que me auxiliaram na escrita da tese.

- **Ana Carolina de Moura**, obrigada pela ajuda no RT-PCR e na revisão do inglês. Teus conhecimentos foram valiosos, obrigada.

- **Grasiela Agnes**, obrigada por toda a segurança e conhecimentos repassados no Laboratório de Biologia Molecular, tuas sugestões foram diferenciais em todas as etapas desse trabalho, em especial nas placas de RT-PCR.

Agradeço à **UFGRS** e a todos os **colaboradores do PPG** da Fisiologia, professores, funcionários, amigos e colegas de mestrado e doutorado.

Ao **CAPES** pela concessão da bolsa.

Aos **familiares**, agradeço pelo apoio que sempre demonstraram e pelos cuidados com o Murillo.

Aos meus pais **Bertilo e Vânia**, agradeço todo o amor e educação dedicados. Pelo incentivo em buscar o conhecimento.

Aos **amigos queridos** agradeço pelo aconchego, força, carinho e amizade. São muitos os amigos especiais que participaram desses longos anos, que estiveram presente fazendo a diferença nessa etapa da minha vida.

Um agradecimento especial ao meu marido **Marcelo** que a cada dia faz com que nosso amor cresça e se solidifique. Obrigada pelo tempo dedicado, pelos mínimos detalhes observados, por ser um pai e marido amoroso e atencioso. Obrigada!

Ao **Murillo**, agradeço todos os dias por existir. Por me fazer a pessoa mais completa. Pelo amor diário, pela alegria, educação e por ser essa criança extremamente doce e amorosa.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AVP: vasopressina

AVPR: receptor de vasopressina

AVPR_{1a}: receptor de vasopressina V_{1a}

BO: bulbo olfatório

CPF: córtex pré-frontal

Ct: limiar do ciclo

DNA: ácido desoxirribonucléico

cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar

DOPA: dopamina

DOPAR_{D2}: receptor de dopamina

ER α : receptor de estrogênio alfa

ER β : receptor de estrogênio beta

EST: estrogênios

ESTR: receptor de estrogênios

HPC: hipocampo

HPT: hipotálamo

Kb: quilobase

RNAm: ácido ribonucléico mensageiro

OT: ocitocina

OTR: receptor de ocitocina

OTKO: camundongos do grupo nocaute para ocitocina

PCR: reação em cadeia da polimerase

PROG: progesterona

PVN: núcleos hipotalâmicos paraventricular

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase

SON: supraóptico

SNC: sistema nervoso central

WT: camundongos do grupo controle

RESUMO

As relações sociais são construídas e mantidas a partir da interação entre os indivíduos. A ocitocina (OT), vasopressina (AVP), estrogênios (EST) e dopamina (DOPA), bem como seus respectivos receptores estão envolvidos na modulação do comportamento sexual de fêmeas. Estruturas do sistema nervoso central (SNC), tais como o bulbo olfatório (BO), o hipotálamo (HPT), o córtex pré-frontal (CPF) e o hipocampo (HPC) exercem importantes funções relacionadas à motivação sexual, reconhecimento de odores, memória e respostas emocionais. Em camundongos fêmeas, a OT é essencial para o comportamento de lordose e para estabelecer a preferência pelo parceiro. Este estudo teve como objetivo analisar o impacto do nocauteamento no gene da OT (OTKO) no comportamento sexual de camundongos fêmeas, na síntese hipotalâmica de AVP e na expressão gênica dos receptores de OT (OTR), AVP (AVPR_{1a}), EST alfa (ER α), EST beta (ER β) e DOPAR_{D2} no BO, HPT, CPF e HPC. Foram utilizados 11 camundongos fêmeas (C57BL/6J) para o grupo controle (WT) e o mesmo número para o grupo OTKO. A detecção do transgene no genoma foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e os animais foram classificados como: WT (OT+/+), heterozigoto (OT+/-) e OTKO (OT-/-). O teste do comportamento sexual da fêmea foi realizado na noite do proestro e os parâmetros comportamentais avaliados foram: frequência, duração e latência de lordose, além da frequência de montas, bem como as posturas não receptivas e a locomoção. A coleta das estruturas encefálicas (BO, HPT, CPF e HPC) aconteceu na manhã seguinte do teste comportamental. Os cDNAs foram sintetizados por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). A expressão gênica de cada receptor foi calculada a partir da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os dados do registro comportamental e da expressão gênica foram expressos pela média, erro padrão da média (\pm EPM), analisados pelo teste de Mann-Whitney e o nível de significância aceito foi de $p < 0,05$. Nossos resultados mostraram aumento significativo da latência e diminuição significativa da frequência e da duração do comportamento de lordose em fêmeas OTKO. Em relação às posturas não receptivas, fêmeas OTKO apresentaram diminuição significativa da latência e aumento significativo da frequência e da duração destas posturas. No que concerne à expressão gênica dos diferentes receptores, fêmeas OTKO apresentaram diminuição significativa da expressão gênica do OTR apenas no HPC em relação ao grupo WT. Verificamos que o grupo OTKO apresentou diminuição significativa da expressão gênica do AVPR_{1a} apenas no HPT, mas aumento da expressão no HPC quando comparadas ao grupo WT. Também, fêmeas OTKO apresentaram diminuição significativa da expressão gênica do ER α e ER β apenas no CPF quando comparadas ao grupo WT. Não foram encontradas diferenças significativas na expressão gênica do DOPAR_{D2} em nenhuma das estruturas estudadas quando comparados os dois grupos estudados. No que diz respeito ao nocauteamento no gene da OT, nossos resultados mostraram que este não promove diferença significativa na síntese de RNAm de AVP no HPT do grupo OTKO quando ao grupo WT. Nossos principais achados nos permitem inferir que a ausência da OT dentro do SNC, bem como a importante alteração da expressão dos genes estudados (OTR, AVPR_{1a}, ER α e ER β) principalmente no CPF estão relacionados com a diminuição do comportamento sexual observada nas fêmeas OTKO.

Palavras-chave: vasopressina, estrogênios, dopamina, OTKO, camundongo.

ABSTRACT

Social relations are built and maintained from the interaction between individuals. Oxytocin (OT), vasopressin (AVP), estrogens (EST), dopamine (DOPA) and their receptors are involved in the modulation of sexual behavior in females. Structures of the central nervous system (CNS), such as the olfactory bulb (OB), hypothalamus (HPT), medial amygdale, prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HPC) have important functions related to sexual motivation, odor recognition, memory, and emotional responses. In mice, OT is essential for lordosis behavior and to establish the female preference for her partner. The experimental model using knockout animals for OT allows evaluating the physiological and behavioral changes generated from this genetic manipulation. This study aimed to analyze the impact of OT gene knockout (OTKO) in sexual behavior of female mice, in the synthesis hypothalamic of AVP and gene expression of OT receptors (OTR), AVP (AVPR_{1a}), EST alpha (ER_α), EST beta (ER_β) and DOPAR_{D2} in OB, HPT, PFC and HPC. We used 11 female mice (C57BL/6J) for the control group (WT) and the same number for the OTKO group. Detection of the transgene in the genome was performed by polymerase chain reaction (PCR) and the animals were classified as: WT (OT+/+), heterozygous (+/-OT) and OTKO (OT-/-). The female sexual behavior test was performed on the evening of proestrus and these behavioral parameters were evaluated: frequency, duration and latency lordosis, frequency of mounts, as well as non-receptive positions and locomotion. The collection of brain structures (OB, HPT, PFC and HPC) happened the next morning the behavioral test. The cDNAs were synthesized by reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR). The gene expression of each receptor was calculated from the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula. Data from the behavioral record and gene expression were expressed as mean, standard error of the mean (\pm SEM) and analyzed by the Mann-Whitney test. In all cases, $P < 0.05$ was considered statistically significant. Our results showed significant increase in latency and decrease in the frequency and duration of lordosis behavior in OTKO females. For non-receptive postures, OTKO females were significantly reduced latency and increased frequency and duration of these postures. Regarding the gene expression of different receptors, OTKO females showed significant decrease in OTR gene expression only in the HPC compared to WT group. We found that the OTKO group showed a significant decrease in gene expression of AVPR_{1a} only in HPT, but increased expression in HPC as compared to WT group. Also, OTKO females showed significant decrease in gene expression of ER_α and ER_β only the PFC when compared to the WT group. There were no significant differences in gene expression DOPAR_{D2} in any of the studied structures when comparing the two groups. Regarding knockout in OT gene, our results showed that this does not promote significant difference in AVP mRNA synthesis in HPT of OTKO group when the WT group. Our main findings allow us to infer that the absence of OT within the CNS, as well as a significant changes in expression of the genes studied (OTR, AVPR_{1a}, ER_α and ER_β) mainly in the PFC are related to decreased sexual behavior observed in OTKO females.

Key words: OTKO, vasopressin, estrogens, dopamine, female sexual behavior.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Diagrama simplificado dos circuitos neurobiológicos do reflexo de lordose em mamíferos do sexo feminino.....26
- FIGURA 2.** Gel de agarose (1,5%) mostrando os produtos da PCR utilizados para classificar os animais em WT (180pb/180pb), heterozigoto (180pb/480pb) e OTKO (480pb/480pb).....44
- FIGURA 3.** Quantificação relativa da expressão gênica do receptor de ocitocina no sistema nervoso central de fêmeas controle (WT) e nocaute para o gene da OT (OTKO). Os dados foram expressos por média [±EPM]. Mann-Whitney (Teste U de Mann-Whitney).....54
- FIGURA 4.** Quantificação relativa da expressão gênica do receptor de vasopressina no sistema nervoso central de fêmeas controle (WT) e nocaute para o gene da OT (OTKO). Os dados foram expressos por média [±EPM]. Mann-Whitney (Teste U de Mann-Whitney).....55
- FIGURA 5.** Quantificação relativa da expressão gênica do receptor estrógeno α no sistema nervoso central de fêmeas controle (WT) e nocaute para o gene da OT (OTKO). Os dados foram expressos por média [±EPM]. Mann-Whitney (Teste U de Mann-Whitney).....56
- FIGURA 6.** Quantificação relativa da expressão gênica do receptor de estrógeno β no sistema nervoso central de fêmeas controle (WT) e nocaute para o gene da OT (OTKO). Os dados foram expressos por média [±EPM]. Mann-Whitney (Teste U de Mann-Whitney). * diferença em relação ao grupo WT.....57
- FIGURA 7.** Quantificação relativa da expressão gênica do receptor de dopamina no sistema nervoso central de fêmeas controle (WT) e nocaute para o gene da OT (OTKO). Os dados foram expressos por média [±EPM]. Mann-Whitney (Teste U de Mann-Whitney).....58
- FIGURA 8.** Quantificação relativa da síntese de RNAm de vasopressina no hipotálamo de fêmeas controle (WT) e nocaute para o gene da OT (OTKO). Os dados foram expressos por média [±EPM]. Mann-Whitney (Teste U de Mann-Whitney).....59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sequências dos <i>primers</i> dos receptores estudados	49
TABELA 2. Sequências dos <i>primers</i> dos genes de referência (genes constitutivos)	50
TABELA 3. Comportamento sexual de camundongos fêmeas.....	52
TABELA 4. Locomoção em camundongos fêmeas	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OCITOCINA	16
1.2	COMPORTEAMENTO SEXUAL EM FÊMEAS	20
1.3	OCITOCINA E COMPORTEAMENTO SEXUAL	23
1.4	ESTRUTURAS DO SISTEMA NERVOSO ENVOLVIDAS NO COMPORTEAMENTO SEXUAL	25
1.4.1	Circuitos neurobiológicos do comportamento sexual	26
1.4.2	Bulbo olfatório	27
1.4.3	Hipotálamo	29
1.4.4	Córtex pré-frontal	29
1.4.5	Hipocampo	31
1.4.6	Amígdala	32
1.4.7	Núcleo accumbens	32
1.5	NEUROTRANSMISSORES E HORMÔNIOS ENVOLVIDOS NO COMPORTEAMENTO SEXUAL	33
1.5.1	Vasopressina	34
1.5.2	Estrogênios	34
1.5.3	Dopamina	36
2	JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	Animais	42
4.2	Aspectos Éticos	42
4.3	Genotipagem	43
4.4	Ciclo Estral	44
4.5	Teste do comportamento sexual	45
4.6	Coleta de material biológico	46
4.7	Extração de RNA	46

4.8	Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	47
4.9	Análise estatística	50
5	RESULTADOS.....	52
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÕES	68
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
9	ANEXOS	84
9.1	ANEXO I – PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA	84
9.2	ANEXO II – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA PHYSIOLOGY & BEHAVIOR	86
9.3	ANEXO III – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA FRONTIERS IN PSYCHIATRY.....	115

1 INTRODUÇÃO

A luta pela sobrevivência implica em relações de interdependência entre as espécies e, acima de tudo, na sua aptidão e sucesso em deixar descendentes (DARWIN, 1859). A vantagem evolutiva de uma espécie dependerá de mutações que se transmitem ao longo de gerações. Esta seleção de sobrevivência pode advir do aprimoramento de sistemas fisiológicos homeostáticos ou de comportamentos fundamentais, tais como os comportamentos alimentar, reprodutivo, agressivo ou defensivo (SCHENBERG *et al.*, 2005).

A evolução molda a arquitetura da mente, produzindo mecanismos cognitivos e neurais que são projetados para resolver problemas adaptativos encontrados pelos nossos ancestrais. No caso dos homínídeos, um dos maiores desafios adaptativos foi a convivência e a interação social: aprender a selecionar companheiros, a formar alianças e a competir por recursos limitados (BARBEY *et al.*, 2009).

As respostas comportamentais de um indivíduo são oriundas da sua interação com o ambiente. As diferentes respostas comportamentais ao ambiente são geralmente atribuídas como comportamento não social (comportamento de manutenção ou de exploração) ou comportamento social (à reprodução, agressividade, submissão ou fuga) (CLASSEN, 2000).

Os comportamentos sociais em ratos adultos podem ser classificados em categorias, incluindo reconhecimento social, interação social, comportamento sexual, comportamento parental e comportamento agressivo (GIOVENARDI *et al.*, 2000; GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001). As relações sociais são construídas e mantidas a partir das interações entre os indivíduos. Segundo Slater (2000), o

reconhecimento de um indivíduo como integrante de um grupo social é fundamental para o funcionamento do grupo. Dessa forma, se estabelecem vantagens adaptativas na formação de grupos sociais, tais como:

1. Os animais em grupos são atacados menos frequentemente do que animais solitários;
2. O desgaste físico para alcançar e abater uma caça é menor, pois vários animais se engajam na busca e perseguição da presa resultando em maior eficiência;
3. A convivência com animais mais velhos proporciona aos mais jovens a aprendizagem, por imitação, de tarefas essenciais para a sobrevivência.

Os comportamentos sociais podem ser considerados positivos, quando ocorrem benefícios mútuos, ou negativos, quando se enquadra o comportamento agressivo. As ligações sociais podem se formar entre pais e filhos, entre dois adultos ou entre outros membros do grupo e possui várias vantagens, entre elas a de garantir a sobrevivência da espécie (CARTER & KEVERNE, 2002).

1.1 OCITOCINA

A ocitocina (OT) possui ações periféricas e centrais. Atualmente, a OT destaca-se pelo papel na modulação dos comportamentos sociais (PEDERSEN & PRANGE, 1979; GIOVENARDI *et al.*, 1998).

Os corpos celulares dos neurônios localizados nos núcleos hipotalâmicos paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) produzem e liberam os neuropeptídeos OT e vasopressina (AVP), bem como suas proteínas carreadoras,

as neurofisinas (CUNNINGHAM & SAWCHENKO, 1991).

O PVN localiza-se bilateralmente ao terceiro ventrículo, onde duas populações de neurônios ocitocinérgicos estão bem destacadas, os neurônios magnocelulares e os neurônios parvocelulares. Os neurônios magnocelulares localizam-se nas porções laterais do PVN, os neurônios parvocelulares localizam-se medialmente e constituem uma população heterogênea de neurônios, contendo múltiplos neurotransmissores destinados à realização de diversas funções (BADOER, 2001).

Três zonas funcionais são descritas no PVN: zona magnocelular, mediocelular e parvocelular (KISS *et al.*, 1991). A zona magnocelular contém grandes células secretoras, os axônios desta região são projetados para neurohipófise, formando assim o sistema hipotálamo-neurohipofiseal. Este sistema é dependente da atividade elétrica dos neurônios magnocelulares, que são ativados ou inibidos principalmente por glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) (OLIET & PIET, 2004). Potenciais de ação nessas células neurosecretoras desencadeiam a liberação da OT dos terminais axonais na neurohipófise para a corrente sanguínea (GIMPL & FARENHOLZ, 2001). A OT também é produzida na divisão parvocelular do PVN, porém em menores quantidades. Os neurônios desta divisão se projetam para áreas diferentes do encéfalo, tais como: bulbo olfatório (BO), amígdala, hipocampo (HPC), hipotálamo (HPT), núcleo accumbens entre outras (para revisão, GIMPL & FARENHOLZ, 2001; MANTELLA *et al.*, 2003). A OT que é sintetizada pelos neurônios parvocelulares do PVN, pode ainda, ser liberada diretamente no líquido por dendritos da parede do terceiro ventrículo (DOGTEROM *et al.*, 1977; apud LECKMAN *et al.*, 1994).

A OT é um nonapeptídeo hidrossolúvel que possui uma ponte *cis-cis* nas posições 1-6, importante para o reconhecimento e ligação do hormônio ao receptor (CUNNINGHAM, 1999). Este hormônio é membro da família das proteínas neurohipofisárias, que está tradicionalmente relacionado ao parto e à lactação (GIMPL & FARENHOLZ, 2001), estruturalmente assemelha-se à AVP, diferindo-se desse por apenas dois aminoácidos (ACHER *et al.*, 1995; CALDWELL & YOUNG, 2006).

Os genes que codificam a OT e a AVP são altamente homólogos e localizados no mesmo cromossomo, mas com orientação transcricional oposta (YOUNG & GAINER, 2003). A distância entre esses genes variam de 3 a 12 kb em camundongos (HARA *et al.*, 1990), humanos (SAUSVILLE *et al.*, 1985) e ratos (MOHR *et al.*, 1988). Nos camundongos os genes da OT e da AVP estão localizados no cromossomo 2 e no homem no cromossomo 20 (HARA *et al.*, 1990).

Somente um tipo de receptor para OT (OTR) é reconhecido e clonado (CALDWELL *et al.*, 2008; LUCION & BORTOLINI, 2014). Este receptor está amplamente distribuído no encéfalo, variando a localização de acordo com a espécie e o gênero. OTR pertence à família dos receptores hetero-triméricos acoplados à proteína G, é expresso por diversos tipos de células, incluindo neurônios, células ósseas, mioblastos, cardiomiócitos e células endoteliais (GIMPL & FARENHOLZ, 2001; ZINGG & LAPORTE, 2003). Ele pode estar associado tanto a proteínas G do tipo $G_{q/11}$ como as proteínas G_i , e seus efeitos intracelulares dependem do tipo de acoplamento (WETTSCHURECK *et al.*, 2004; REVERSI *et al.*, 2005).

Receptores associados à proteína $G_{q/11}$ promovem a ativação de uma fosfolipase C capaz de quebrar o fosfatidil de inositol-4,5-bifosfato (PIP_2) em inositoltrifosfato (IP_3) e diacilglicerol, que por sua vez, medeiam uma série de efeitos intracelulares, incluindo a liberação de cálcio de estoques do retículo endoplasmático (ALBERTS *et al.*, 1994). Os receptores associados à proteína G_i têm caráter inibitório, pois promovem a inibição da enzima adenilato-ciclase e, conseqüentemente, a redução dos níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), a abertura dos canais de potássio e o fechamento dos canais de cálcio (ALBERTS *et al.*, 1994).

O OTR apresenta-se, frequentemente, oligomerizado na superfície da célula mesmo na ausência de ligantes, e pode ser encontrado oligomerizado com receptores da família da AVP (V_1 e V_2). No entanto, o papel desse processo de oligomerização do OTR na transdução do sinal não está bem elucidado (DEVOST & ZINGG, 2004).

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 à habilidade da OT para exercer diversos efeitos comportamentais (BALE *et al.*, 2001). Em roedores, a presença de OTR ocorre principalmente no bulbo e tubérculo olfatórios, neocórtex, núcleos basais, córtex piriforme, no córtex insular e perirrinal, formação hipocampal, amígdala central, núcleo da base da estria terminal, septo lateral, núcleo accumbens e HPT ventromedial, núcleo do trato solitário e área tegmental ventral complexo mamilar, oliva dorsal, núcleo espinhal trigeminal, tronco encefálico e medula espinhal

(INSEL, 1991; MORRIS *et al.*, 1995; PEDERSEN *et al.*, 1995; VEINANTE & FREUND-MERCIER, 1997).

As ações periféricas incluem a contração das células mioepiteliais que envolvem os alvéolos e ductos das glândulas mamárias e no músculo liso do endométrio, naquele estimulando a ejeção do leite e neste as contrações rítmicas no útero que são responsáveis pela expulsão do feto (SAMSON & SCHELL, 1995). Participa também da modulação da função renal, da secreção de insulina e glucagon pelo pâncreas e secreção de aldosterona pela glândula adrenal. No sistema cardiovascular, a OT induz a vasodilatação e diminui as contrações do miocárdio (GIMPL & FARENHOLZ, 2001).

As ações centrais da OT incluem participação no circuito ansiolítico central, na resposta supressora mediante estresse crônico, no controle do apetite pelo sal, no controle da pressão arterial e na resposta a diversos tipos de estresse em eventos hemorrágicos, ambientes novos e comportamentos sociais (PEDERSEN & PRANGE, 1979; LANG *et al.*, 1983; SAMSON & SCHELL, 1995; GIOVENARDI *et al.*, 1998; NEUMANN, 2002; CARRASCO & VAN DE KAR, 2003; MICHELINI *et al.*, 2003; RIGATTO *et al.*, 2003; BERNATOVA *et al.*, 2004).

1.2 COMPORTAMENTO SEXUAL EM FÊMEAS

Os comportamentos sociais são fundamentais para a manutenção das espécies e requerem dois ou mais animais com instinto e motivação para permanecerem próximos (CARTER & KEVERNE, 2002). A OT é liberada durante as interações sociais percebidas como positivas (para uma revisão ver UVNAS-MOBERG, 1998).

A sobrevivência das espécies depende do seu sucesso reprodutivo. Além

da coordenação dos processos fisiológicos com o meio, a reprodução necessita de vários circuitos integrados que culminam com a fertilização (DEBIEC, 2007).

O sistema reprodutivo feminino é regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário. O principal regulador desse eixo é o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), produzido pelos neurônios da área preóptica medial e núcleo arqueado do HPT. O GnRH é secretado dentro do sistema porta-hipofisário, onde estimula a produção do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH). O LH, por sua vez, estimula o ovário a secretar estrogênios (EST) e progesterona (PROG) (RIVEST & RIVIER, 1995; FERIN, 1996).

A secreção pulsátil e o pico de LH dependem da atividade dos neurônios GnRH (KALRA & KALRA, 1983). Em roedores, no período de metaestro-proestro, aproximadamente 10% dos neurônios GnRH co-expressam OTR na área preóptica medial. Dessa forma, a OT também pode interferir na secreção de LH e na ovulação (CALIGIONI *et al.*, 2007).

Embora a influência das gônadas no comportamento sexual tem sido empiricamente conhecida por centenas de anos, experimentos realizados no início do século XX, sugerem a existência de fatores humorais que regulam não só o comportamento sexual, mas também as características morfológicas que definem gênero (ANTUNES *et al.*, 2010). Em ratas, o comportamento sexual depende significativamente das flutuações hormonais do EST (ANTUNES *et al.*, 2010), da PROG (ANTUNES *et al.*, 2010) e da OT (WITT, 1995). Injeções intracerebroventriculares de OT, em fêmeas ovariectomizadas, tratadas com EST/PROG aumentam a frequência e a duração de lordoses (ARLETTI & BERTOLINI, 1985). A frequência de lordoses também aumenta quando EST/OT (CALDWELL *et al.*, 1986) ou PROG/OT (GORZALKA & LESTER, 1987) são

administrados separadamente.

A indução do comportamento sexual em fêmeas é mediada principalmente pela área preóptica medial e ventromedial do HPT (KOW & PFAFF, 1998). A ocorrência do comportamento sexual feminino requer a ação do EST no cérebro e a indução de OTR no HPT ventromedial (BALE & DORSA, 1995). De fato, o ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para OTR está presente desde a região rostral até a parte caudal do HPT ventromedial de fêmeas, sendo que a expressão do OTR aumenta na divisão ventrolateral em resposta ao EST e a PROG (OSTROWSKI, 1998).

Em fêmeas, o tempo dispensado nos comportamentos sociais pode ser alterado pela fase do ciclo estral. Em ratas, a fase de proestro tem a duração aproximada de doze horas e culmina com maior interação social (FRYE & RHODES, 2008). O comportamento sexual das fêmeas ocorre predominantemente na noite do proestro, que perdura por aproximadamente 18 horas (ANTUNES *et al.*, 2010) e caracteriza-se pela presença de muitas células epiteliais nucleadas e poucos leucócitos no muco vaginal (NELSON, 2005).

O comportamento sexual em fêmeas tem dois principais componentes que são a proceptividade e a receptividade (ANTUNES *et al.*, 2010). Nos componentes proceptivos inclui-se a investigação das genitais do macho, pequenas corridas/pulos dentro da caixa, vocalizações, exposição de partes do corpo e contatos físicos efêmeros (EDWARDS, 1970).

O componente receptivo mais importante do comportamento sexual é o reflexo de lordose que corresponde à postura assumida pela fêmea no momento da cópula. A postura de receptividade é caracterizada pela flexão dorsal da coluna vertebral em resposta à monta realizada pelo macho. Na ausência de

lordose a intromissão peniana e a ejaculação não são possíveis, demonstrando a importância deste comportamento para o sucesso reprodutivo (NELSON, 2005; BONTHUIS *et al.*, 2010).

1.3 OCITOCINA E COMPORTAMENTO SEXUAL

A OT possui importante papel nas interações sociais, tanto no comportamento sexual (ARLETTI & BERTOLINI, 1985), como no comportamento maternal (CONSIGLIO & LUCION, 1996; GIOVENARDI *et al.*, 1998; BARTELS & ZEKI, 2004) e no comportamento agressivo maternal (ENGELMANN *et al.*, 2000; AMICO *et al.*, 2004; CARTER, 2005) e no comportamento de autolimpeza (*grooming*) (DRAGO *et al.*, 1986). Wallner e colaboradores (2006) descreveram liberação plasmática de OT durante encontros sociais, sexuais ou não, em ratos machos e fêmeas. Engelman *et al.* (2000) sugere que a OT também pode ser liberada durante a escolha e a formação de pares sexuais.

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 (LIM & YOUNG, 2006). A capacidade de reconhecimento social consiste em pré-requisito para vários tipos de comportamentos sociais, pois estabelece as ligações sociais e as hierarquias dentro de um grupo (CHOLERIS *et al.*, 2004). A formação de pares sociais e os comportamentos reprodutivos também dependem da capacidade de reconhecer indivíduos familiares e não familiares dentro da mesma espécie (para revisão, FERGUSON *et al.*, 2002).

O processo reprodutivo é dependente do papel da OT e da AVP (DEBIEC, 2007). A OT representa um importante indutor do comportamento sexual, da

excitação e do orgasmo (CARMICHAEL *et al.*, 1987). Em ratos machos, a injeção central de OT no HPC ou no PVN pode provocar o mecanismo da ereção peniana (GIMPL & FARENHOLZ, 2001). Em machos de várias espécies, a liberação sistêmica de OT pode estar envolvida na ejaculação agindo no músculo liso do sistema reprodutivo e regulando a espermatogênese em ratos (CUNNINGHAM & SAWCHENKO, 1991; GIMPL & FARENHOLZ, 2001). Além disso, altas concentrações de OT foram encontradas no líquido-cérebro-espinhal de machos após a ejaculação (SABATIER, 2006). Nishitani e colaboradores (2004) mostraram que neurônios ocitocinérgicos no PVN de ratos machos sexualmente experientes são ativados após a exposição desses animais aos odores de uma fêmea em estro.

A administração de um antagonista da OT causa redução nos componentes receptivos e proceptivos do comportamento sexual de fêmeas (WITT & INSEL, 1991; CALDWELL, 1992). Para Pedersen & Boccia (2006) a OT e AVP exercem efeitos opostos sobre o comportamento sexual de fêmeas. Ambos os efeitos antagônicos estão relacionados com a área preóptica medial, sugerindo que as interações entre OT e AVP possam contribuir para a regulação do comportamento sexual em fêmeas (CALDWELL, 1992).

Em camundongos, a deleção do gene da OT (OTKO), além de cessar a transcrição de OT, diminuiu a transcrição do gene da AVP no PVN e no SON (YOUNG *et al.*, 1996; OZAKI *et al.*, 2004). No entanto, a reposição do gene da OT restaura a expressão do gene da AVP (YOUNG *et al.*, 1998). Camundongos machos OTKO apresentam redução da concentração plasmática basal de AVP (LAZZARI *et al.*, 2013), já fêmeas OTKO não apresentam diferenças nas concentrações plasmáticas basais de AVP quando comparadas ao grupo controle

(WT) (BECKER *et al.*, 2013).

Em camundongos, o papel da OT na função gonadal está implicado na capacidade de estimular a ovulação (ROBINSON & EVANS, 1990). Uma das metodologias utilizadas para avaliar alterações na ovulação é a contagem de oócitos, uma vez que roedores, com ciclo estral regular, apresentam um número de oócitos entre 10 e 14 a cada ciclo (GOMEZ *et al.*, 1999). Em fêmeas OTKO há uma redução do número de oócitos presentes nos ovidutos na manhã do estro. No entanto, essas fêmeas aumentam a densidade de espinhos dendríticos proximais na amígdala medial póstero-dorsal na fase de proestro (BECKER *et al.*, 2013). Os resultados de Becker *et al.*, (2013) mostram que a OT modula o comportamento sexual de camundongos, pois em fêmeas OTKO há diminuição significativa na frequência, latência, duração e quociente de lordose em relação ao grupo WT.

1.4 ESTRUTURAS DO SISTEMA NERVOSO ENVOLVIDAS NO COMPORTAMENTO SEXUAL

Compreender os mecanismos moleculares envolvidos na regulação de vias de sinalização no sistema nervoso central (SNC) tem sido à base de muitos estudos comportamentais em Neurociências. Muitas estruturas são responsáveis pelo surgimento e/ou manutenção dos comportamentos, entre elas, ganham destaque: BO, córtex pré-frontal (CPF), HPC, estriado, amígdala medial e área preóptica medial (DE MOURA *et al.*, 2014).

1.4.1 Circuitos neurobiológicos do comportamento sexual

Diversos estudos realizados em mamíferos demonstram que há uma organização neuroanatômica específica para a cópula (KOW *et al.*, 2007; WUNSCH, 2014). Os principais circuitos neurobiológicos do comportamento reprodutivo de roedores fêmeas estão esquematizados na Figura 1.

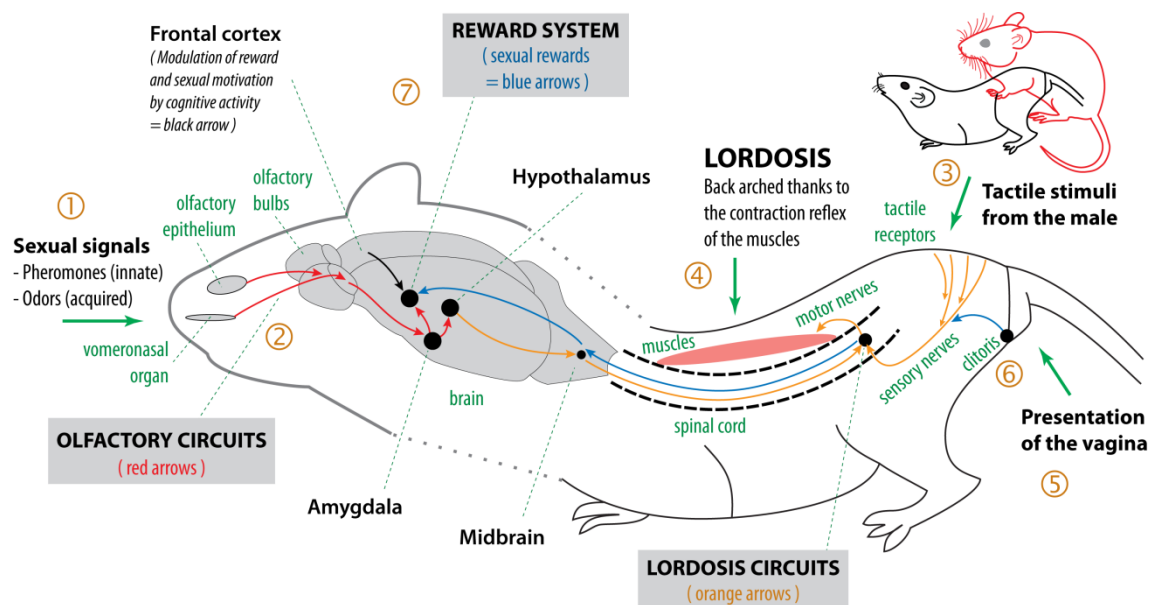


Figura 1. Diagrama simplificado dos circuitos neurobiológicos do reflexo de lordose em mamíferos do sexo feminino. Diagrama adaptado de: Agmo A. Functional and dysfunctional sexual behavior. Elsevier, 2007.

Podemos observar que o comportamento sexual, exige uma circuitaria neural organizada em uma sequência de eventos:

1) Odores, especialmente feromônios, permitem a troca de sinais sexuais entre parceiros potenciais;

2) Circuitos olfatórios (setas em vermelho) tornam possível o reconhecimento do parceiro do sexo oposto e provocam a excitação sexual, que por sua vez, induz a lubrificação vaginal, montagem e cópula;

3) Quando o macho monta a fêmea, estímulos táteis do macho desencadeiam o reflexo do comportamento de lordose na fêmea;

4) Os circuitos de lordose (setas em laranja) provocam o arqueamento ventral da espinha, que eleva os quadris, facilitando assim a penetração pelo macho;

5) O contato tátil entre o órgão copulador masculino e a área genital feminina, aciona os movimentos reflexos de pelve do macho (movimentos pélvicos), em seguida, intromissão. Depois de intromissão, os movimentos pélvicos desencadeiam o reflexo da ejaculação;

6) A estimulação tátil do clitóris (e do órgão copulador masculino), durante a cópula, são transmitidos para o cérebro (setas em azul);

7) A ativação do sistema de recompensa induz aprendizagem que otimiza a cópula (em particular pelo desenvolvimento da motivação sexual).

Além disso, sinais auditivos e visuais, percebidos durante a cópula, podem ser condicionados pelos estímulos sexuais, otimizando os sinais feromonais inatos (KOW *et al.*, 2007).

1.4.2 Bulbo olfatório

O sistema olfatório se diferencia anatomicamente em dois sistemas distintos, que diferem quanto à natureza da informação processada. O sistema olfatório principal integra informações advindas do epitélio olfatório, que seguem para o BO principal que, por sua vez, se projeta diretamente para as porções póstero-lateral e anterior do núcleo cortical da amígdala, área de transição pós-

piriforme e área amígdalo-piriforme, e indiretamente para núcleo posterior da amígdala, porção posterior do núcleo basolateral, accumbens e HPC, entre outras (SWANSON & PETROVICH, 1998).

O sistema olfatório acessório é composto pelo órgão vomeronasal, BO acessório e suas projeções (a) diretas para estruturas como o núcleo medial da amígdala e região póstero-medial do núcleo cortical da amígdala, e (b) indiretas para amígdala posterior, HPT medial, subculum ventral, ínsula agranular e porção medial do córtex pré-frontal (DE OLMOS *et al.*, 1978; SWANSON & PETROVICH, 1998; MONCHO-BOGANI *et al.*, 2002). Entre as estruturas do sistema olfatório acessório, apenas o núcleo posterior da amígdala não está envolvido diretamente no processamento de informações provenientes do órgão vomeronasal; diferentemente, o núcleo medial da amígdala parece estar fortemente envolvido no processamento de informações oriundas dessa estrutura (DE OLMOS *et al.*, 1978; CANTERAS *et al.*, 1995; SWANSON & PETROVICH, 1998; MONCHO-BOGANI *et al.*, 2002; MEREDITH & WESTBERRY, 2004).

Dentro de uma mesma espécie, a formação de pares sociais e os comportamentos reprodutivos, também dependem da capacidade de reconhecer indivíduos familiares ou não-familiares (para revisão FERGUSON *et al.*, 2002). Em roedores, o BO principal e o acessório são ativados nos encontros sociais e são cruciais para este reconhecimento. O BO principal é responsável por discriminar uma grande variedade de odores presentes no ambiente, gerando assim, diversos comportamentos (DE OLMOS *et al.*, 2004), dentre eles o comportamento sexual. O BO acessório por sua vez, detecta uma faixa menor de odores, como feromônios, transmitindo a informação para iniciar um comportamento específico ou respostas endócrinas (DE OLMOS *et al.*, 2004).

1.4.3 Hipotálamo

O HPT é uma estrutura do SNC que possui destaque no comportamento sexual de roedores. O comportamento de lordose depende da ação dos esteroides sexuais, bem como da ativação de uma circuitaria neural a qual envolve o HPT. Esta região é responsável por adicionar o componente endócrino a esse mecanismo comportamental, uma vez que os efeitos dos hormônios sexuais nas propriedades eletrofisiológicas dos neurônios, a transcrição do RNAm e a síntese de novas proteínas e estruturas, são primariamente mediados pelo HPT (PFAFF & SCHWARTZ-GIBLIN, 1988).

A área pré-optica medial inibe tonicamente o comportamento sexual, pois quando destruída facilita o comportamento de lordose. Por outro lado, a destruição do HPT ventromedial inibiu a resposta de lordose (ANTUNES *et al.*, 2010).

Tem sido demonstrado que a lesão seletiva dos corpos celulares do HPT anterior altera a proceptividade sem afetar a receptividade sexual (ANTUNES *et al.*, 2010). Entretanto, outro estudo que realizou lesão eletrolítica do HPT anterior promoveu a extinção da lordose (ANTUNES *et al.*, 2010).

1.4.4 Córtex pré-frontal

De acordo com Stuss & Benson (1984), o lobo frontal designa a parte mais anterior dos dois hemisférios cerebrais e, pode ser dividido em três áreas principais: dorsolateral, medial e basilar-orbital. Estão descritas também as seguintes áreas funcionais: área motora-primária (área 4), pré-motora (área 6 e parte posterior da área 8), área de Broca (áreas 44 e 45), campo ocular frontal

(área 8) e o CPF.

O CPF é responsável pela inibição de impulsos e pela gestão de grande parte dos comportamentos que constituem as respostas emocionais, tais como o comportamento sexual, alimentar, motor e o sono. Os impulsos ou instintos operam de forma direta ou indireta, de forma consciente ou não, sobre a geração de comportamentos ou indução de estados fisiológicos que contribuem para a sobrevivência do organismo (DAMÁSIO, 1996; DAMÁSIO, 2000; MILLER & COHEN, 2001).

Segundo Fuster (2001), o CPF não se encontra envolvido exclusivamente em processos cognitivos, porque a região órbito-frontal está relacionada com aspectos emocionais do comportamento e do controle inibitório, já a área medial tem implicações no aspecto motivacional e da iniciativa do comportamento. O CPF medial é uma região do cérebro envolvida na tomada de decisões, na flexibilidade comportamental, além de ser mediador potencial de inibição comportamental.

Em estudo, Davis *et al.* (2010), testaram o papel do CPF medial na inibição do comportamento sexual quando associada a resultados aversivos. Usando um paradigma experimental em ratos, os pesquisadores descobriram que as lesões do CPF medial resultam em um comportamento sexual compulsivo. Em contraste, as lesões não alteraram o desempenho sexual ou o aprendizado associada com recompensa ou estímulos aversivos. Isto indica que a função intacta do CPF medial não é necessária para a expressão normal do comportamento sexual. Os resultados desse estudo apoiam a hipótese de que o CPF medial regula a execução de inibição comportamental em relação ao comportamento sexual uma vez que este comportamento está associado a resultados aversivos.

Animais com lesões no CPF medial provavelmente seriam capazes de formar associações com resultados aversivos do seu comportamento, mas incapazes de suprimir a busca de recompensa sexual em face de consequências aversivas. Coletivamente, estes dados sugerem um papel geral de CPF medial na regulação da busca compulsiva de recompensa (DAVIS *et al.*, 2010).

1.4.5 Hipocampo

Estudos em roedores, envolvendo a indução de danos seletivos e a expressão de genes, possibilitaram a inclusão de outras regiões no circuito neural envolvidos na memória de reconhecimento social; entre elas a região retrohipocampal (BANNERMAN *et al.* 2002), HPC (SQUIRES *et al.*, 2006), as fibras da via perfurante (LEMAIRE *et al.*, 1994), septo medial (FOURNIER *et al.* 1993; TERRANOVA *et al.*, 1994) e regiões frontais (córtex orbitofrontal e giro cingulado anterior). Essas regiões estão direta ou indiretamente relacionadas com regiões que recebem aferências dos bulbos olfatórios (SWANSON & PETROVICH, 1998).

O HPC exerce importantes funções relacionadas ao comportamento, à conversão da memória de curto prazo em memória de longo prazo, memória espacial e de reconhecimento e na regulação da resposta ao estresse (MACHADO, 2006). Essa região é considerada como uma área integrada à tomada de decisões e parte crucial dos sistemas neurobiológicos das emoções (ESPERIDIAO-ANTONIO *et al.*, 2008).

Hitti & Siegelbaum (2014) determinaram que a região CA2 do HPC é essencial para que um animal reconheça outro da mesma espécie, pois em ratos onde essa região foi inativada, verificou-se perda da memória social. Além disso,

este estudo discute que na região hipocampal, há elevado nível de expressão do receptor de AVP (AVPR), neuropeptídeo relacionado com a motivação sexual e com outros comportamentos sociais.

1.4.6 Amígdala

A amígdala ou complexo amigdalóide é uma estrutura heterogênea, constituída de diversos núcleos que podem ser classificados anatomicamente, estruturalmente e funcionalmente (SWANSON & PETROVICH, 1998).

Em roedores, o núcleo medial da amígdala vem sendo associado ao comportamento maternal (SHEEHAN *et al.*, 2001), comportamento sexual (DOMINGUEZ & HULL, 2004), comportamento de dominância (KOLLACK-WALKER & NEWMAN, 1995), comportamento de defesa (SAVONENKO *et al.*, 1999), comportamento agressivo (VOCHTELOO & KOOLHAAS, 1987) e reconhecimento social (FERGUSON *et al.*, 2001).

Em humanos, os estímulos que não podem ser percebidos conscientemente ainda resultam na ativação da amígdala, levando à ideia de que ela pode proporcionar processamento rápido e automático, podendo influenciar na cognição social (ADOLPHS *et al.*, 2009). Estudos de lesões revelaram que o dano à amígdala resulta em uma diminuição da capacidade do indivíduo de reconhecer expressões faciais. Sendo assim, a literatura aponta o envolvimento da amígdala no processamento emocional tanto apetitivo como aversivo (AGGLETON, 2000).

1.4.7 Núcleo accumbens

O núcleo accumbens está localizado na porção ventral do estriado. O

núcleo accumbens recebe projeções de neurônios dopaminérgicos localizados na área tegmental ventral, local de convergência para estímulos procedentes da amígdala, HPC, córtex entorrinal, giro do cíngulo anterior e parte do lobo temporal. Do núcleo accumbens partem eferências para o septo hipocampal, HPT, área cingulada anterior e lobos frontais. Devido às suas conexões aferentes e eferentes o núcleo accumbens desempenha importante papel na regulação da atribuição de saliência (relevância) das emoções, da motivação e da cognição (FERNÁNDEZ-ESPEJO, 2000).

O núcleo accumbens é considerado uma interfase neural entre a motivação e ação motora, e participa de modo decisivo na alimentação, conduta sexual, resposta ao estresse (BEEN *et al.*, 2013).

Não existem evidências claras sobre o papel do núcleo accumbens no controle do comportamento sexual de fêmeas. Entretanto, a lesão aumenta a rejeição da fêmea em relação às tentativas de montas dos machos, porém sem modificar a lordose (RIVAS & MIR, 1991).

1.5 NEUROTRANSMISSORES E HORMÔNIOS ENVOLVIDOS NO COMPORTAMENTO SEXUAL

Antunes *et al.* (2010) afirma que o comportamento sexual é resultado de uma complexa interação entre neurotransmissores, enzimas, hormônios e outras proteínas, que em sequência harmoniosa expressam a habilidade do acasalamento.

1.5.1 Vasopressina

Em mamíferos, várias regiões do SNC, como área septal lateral, HPC, área amígdalo-estriatal, núcleo da base da estria terminal e regiões do HPT expressam receptores para AVP (RUSCIO *et al.*, 2007; CALDWELL *et al.*, 2008) e OT (TRIBOLLET *et al.*, 1992) que determinam diversos comportamentos. A AVP participa da modulação de comportamentos como agressão, agressão em lactantes, memória social, reconhecimento de odores e a preferência na escolha de parceiros (FERGUSON *et al.*, 2002; CALDWELL *et al.*, 2008; CLIPPERTON-ALLEN *et al.*, 2012).

Em fêmeas a expressão de AVP no encéfalo é menor do que em machos (DE VRIES, 2008). A administração central de AVP inibe o comportamento sexual de fêmeas expostas a um macho sexualmente ativo (PEDERSEN & BOCCIA, 2006) e a administração central de um antagonista do AVPR_{1a} estimula a receptividade sexual (CALDWELL *et al.*, 2008). Evidências sugerem que os efeitos comportamentais sexuais são mediados principalmente pelo AVPR_{1a} em circuitos específicos do SNC (KIM *et al.*, 2002).

1.5.2 Estrogênios

Os últimos anos foram marcados pelo avanço no conhecimento da neurofisiologia, principalmente no que tange ao impacto dos esteroides sexuais sobre o SNC. Os esteroides sexuais podem influenciar neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos, modulando o sistema hipotálamo-neuro-hipofisário (SOMPONPUN & SLADEK, 2003; SUZUKI & HANDA, 2005). Em mamíferos observa-se que a alta concentração de OT e do OTR, coincide com a alta

concentração de estradiol plasmático (MITCHELL *et al.*, 1997).

O trabalho publicado por Shepherd (2001) avaliou criticamente a literatura referente ao impacto dos EST sobre as funções cerebrais, pontuando que tal ação é mediada por receptores localizados nos neurônios e, provavelmente, na membrana neuronal. Os receptores de EST podem ser classificados em alfa (α) ($ER\alpha$) e beta (β) ($ER\beta$) e, o grau de expressão destes pode determinar a intensidade da expressão estrogênica (TELLERIA *et al.*, 1998). Segundo Voisin *et al.*, (1997) há expressão dos ER na área preóptica medial, a qual envia projeções para o SON, local de síntese de OT e AVP.

Os hormônios esteroides têm efeitos organizacionais que produzem diferenças sexuais nas conexões e funções do cérebro. Os esteroides sexuais também coordenam mecanismos intrínsecos, tais como ovulação, assim como extrínsecos, tal como o comportamento do animal frente a um parceiro sexual (BECKER, 2008).

Em fêmeas, os comportamentos pré-copulatórios necessitam dos EST de três maneiras: aumentando a disposição da fêmea para se aproximar do macho e induzir os comportamentos sexuais; induzindo a produção de odores, feromônios e vocalizações que tornam a fêmea mais atrativa; promove a conversão de estrogênio para progesterona (BECKER, 2008).

Várias regiões locais do cérebro expressam ER tais como o núcleo arqueado, área pré-óptica, núcleo ventromedial, PVN, entre outros. Estas regiões hipotalâmicas são importantes na modulação dos comportamentos sexuais, reprodutivos, alimentar e na regulação térmica (SIMPSON & DAVIS, 2000).

1.5.3 Dopamina

Em ratos, os esteroides sexuais modulam a atividade dopaminérgica no corpo estriado e no nucleus accumbens (BECKER, 1999) podendo ser importante para algumas respostas motoras durante o comportamento sexual (BECKER, 2008).

Estudos realizados em ratos, macacos e seres humanos, fornecem evidências de que a dopamina (DOPA) por meio de seus diferentes sistemas neuronais e subtipos de receptores desempenha diferentes papéis no controle do comportamento sexual. Enquanto o sistema nigro-estriatal é importante para o controle da coordenação sensório-motora necessária para a cópula, o sistema mesolímbico-mesocortical desempenha um papel chave na excitação sexual e motivação (MESTON & FROHLICH, 2000).

O subtipo de receptor dopaminérgico que está envolvido no controle do comportamento sexual é o D₂, embora estudos sugiram que ocorra uma interação entre os receptores D₁/D₂. Estudos demonstram que tratamentos que aumentam a atividade dopaminérgica no cérebro, melhoraram parâmetros ligados a atividade sexual, apoiando o papel facilitador da DOPA no comportamento sexual (MELIS & ARGOLAS, 1995).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Muitos estudos sobre comportamento têm buscado entender os mecanismos moleculares que regulam processos comportamentais básicos. A genética e a biologia molecular têm contribuído sobremaneira na identificação de genes associados a determinados comportamentos e como alterações genéticas ou fatores ambientais podem interferir na expressão desses genes.

O modelo de experimentação utilizando animais nocautes para um determinado gene permite avaliar as alterações fisiológicas e comportamentais geradas a partir desta manipulação genética (PEREIRA, 2008).

Trabalhos prévios do nosso laboratório utilizaram camundongos OTKO e estudaram comportamento de interação social e sexual de machos (LAZZARI *et al.*, 2013) e de fêmeas (BECKER *et al.*, 2013). Estes estudos demonstraram que o déficit de OT não altera o comportamento sexual em machos, mas promove a diminuição da performance agressiva e aumento da investigação social no teste de interação social. No entanto, em fêmeas o déficit de OT promoveu a diminuição da lordose e do comportamento sexual.

A partir das alterações observadas, tornam-se necessários estudos que possam esclarecer o impacto do nocauteamento do gene da OT na expressão gênica de neurotransmissores/neuropeptídeos e receptores no cérebro destes animais, bem como o que ocorre com o comportamento sexual das fêmeas.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo analisar o comportamento sexual de fêmeas OTKO e o impacto deste nocauteamento na expressão dos receptores de ocitocina, vasopressina, estrogênio α , estrogênio β e dopamina em diferentes áreas do SNC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o comportamento sexual de fêmeas nocautes para o gene da ocitocina;
- Analisar o impacto do nocauteamento no gene da ocitocina na expressão dos receptores de ocitocina, vasopressina, estrogênio α , estrogênio β e dopamina no bulbo olfatório, hipotálamo, córtex pré-frontal, hipocampo de fêmeas OTKO;
- Analisar o impacto do nocauteamento no gene da ocitocina na síntese de vasopressina no hipotálamo de fêmeas OTKO;
- Produzir um artigo de revisão sobre o envolvimento do sistema vasopressinérgico em circuitos cerebrais, na plasticidade sináptica, na evolução e no papel do AVP no comportamento social.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para esse experimento foram utilizadas fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6J, entre 5 a 6 meses de idade e pesavam de 25 a 40g. Os grupos de 4 a 5 animais foram mantidos em caixas de acrílico; com livre acesso à água e a ração; temperatura controlada ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com início da fase escura às 16:00 horas. Os animais foram mantidos no biotério da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), em Porto Alegre, RS, Brasil.

Foram utilizados 11 animais para o grupo WT e 11 animais para o grupo OTKO.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos realizados neste trabalho obedeceram às normas propostas pelos Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences – CIOMS; GOLDIM & RAYMUNDO, 1997*), *Guidelines for Animal Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health* e a Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008). Este trabalho seguiu todos os parâmetros indicados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFCSPA com parecer número 920/09 (ANEXO 1).

4.3 GENOTIPAGEM

A primeira etapa dos experimentos foi a genotipagem dos animais e isto foi feito por volta dos 30 dias de idade. Os animais foram anestesiados com ketamine (80mg/kg) e xylazine (10mg/kg), na sequência, receberam um brinco de identificação e foi coletada a parte distal da cauda (1 a 3 milímetros). A amostra biológica foi armazenada a -20°C. Posteriormente, o DNA da amostra foi extraído utilizando proteinase K. A detecção do transgene no genoma foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos específicos e a enzima de síntese de DNA *Platinum®Taq*.

A separação dos produtos da PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizada na luz ultravioleta. Através da observação da migração das bandas, os animais foram classificados como: WT (OT+/+), heterozigoto (OT+/-) e OTKO (OT-/-), conforme ilustra a figura abaixo. De acordo com Young *et. al.* (1996).

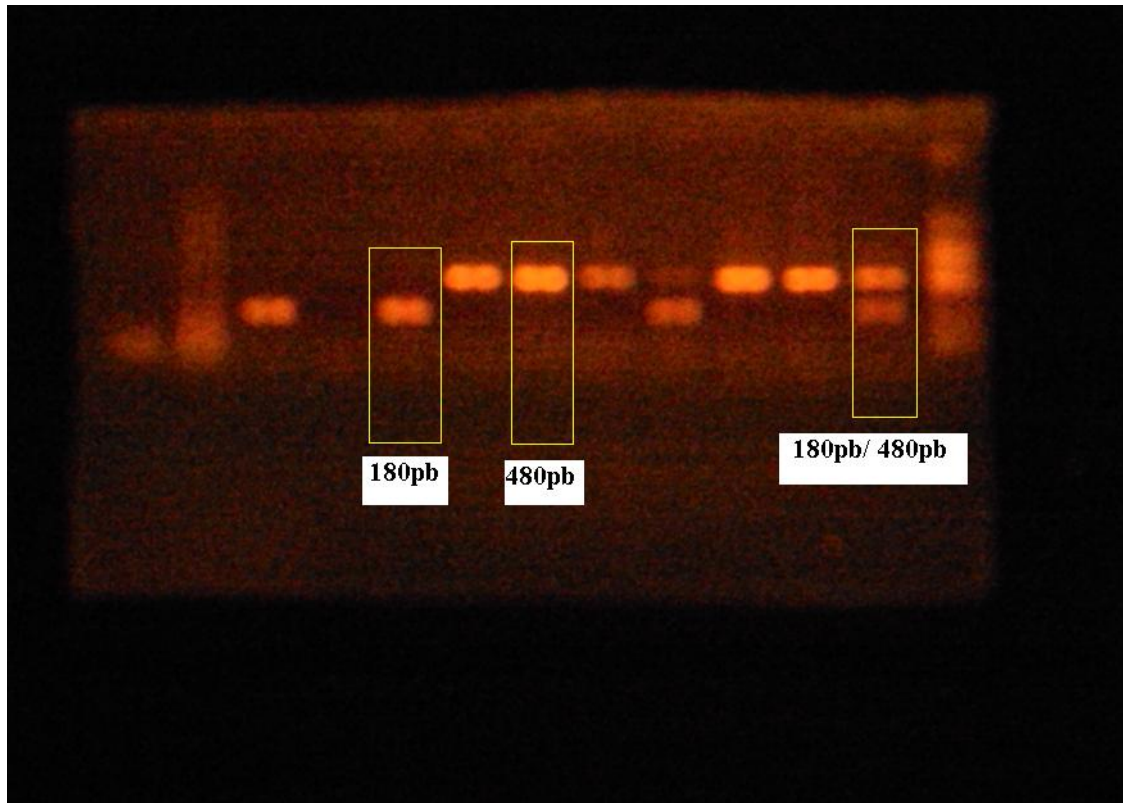


Figura 2. Gel de agarose (1,5%) mostrando os produtos da PCR utilizados para classificar os animais em WT (180pb/180pb), heterozigoto (180pb/480pb) e OTKO (480pb/480pb).

4.4 CICLO ESTRAL

Para a realização do comportamento sexual das fêmeas, a regularidade do ciclo estral foi averiguada através do monitoramento diário durante quinze dias, no período matutino, através da técnica de esfregaço vaginal (SHORR, 1941). A secreção vaginal foi coletada através do lavado com 10 μ l 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 em: diestro (muitos leucócitos e poucas células nucleadas), proestro (predominância de células nucleadas), estro (predominância de células cornificadas) ou metaestro (mesma proporção de leucócitos, células cornificadas e células nucleadas) (MARCONDES, 2002).

4.5 TESTE DO COMPORTAMENTO SEXUAL

O teste do comportamento sexual da fêmea foi realizado na noite do proestro, no mínimo uma hora após o início do ciclo escuro. Inicialmente, o macho sexualmente experiente foi colocado na caixa de observação por um período de 10 minutos para sua adaptação ao novo ambiente. Após esse intervalo, a fêmea foi colocada juntamente com o macho na caixa de observação, a seguir, durante 15 minutos, foi iniciada a sessão de registro do comportamento sexual. Após cada registro comportamental a maravalha da caixa foi trocada (JYOTIKA *et al.*, 2007).

Os parâmetros comportamentais analisados quanto à receptividade da fêmea foram: frequência de lordose (número de vezes que fêmea eleva a parte traseira do dorso após o comportamento de monta realizado pelo macho); duração de lordose; latência de lordose; frequência de montas (número de vezes que o macho coloca as patas dianteiras nos flancos da fêmea). O quociente de lordose (LQ) foi calculado através da fórmula: $LQ = (\text{pontuação total} / \text{número de montas} \times 100)$ (JYOTIKA *et al.*, 2007). Quando a fêmea fugia da monta ela recebeu pontuação igual a zero (0); quando aceitou a monta, porém não apresentou lordose, recebeu pontuação um (1) e quando apresentou lordose recebeu pontuação dois (2). A pontuação total da fêmea foi utilizada para o cálculo do quociente de lordose (JYOTIKA *et al.*, 2007).

Os parâmetros comportamentais analisados quanto a não receptividade da fêmea foram: movimentos executados pelas fêmeas com o objetivo de evitar a monta do macho tais como, abaixar-se, girar o corpo, fugir ou ficar sob duas patas. Também foi averiguado o tempo do deslocamento das fêmeas no interior da caixa.

Os registros comportamentais descritos foram realizados por meio de

filmagem digital e analisados com o auxílio do programa para análise de comportamentos *Noldus Observer* (*Noldus Information Technology*, Holanda).

4.6 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Na manhã seguinte do registro comportamental foi realizada a coleta do material biológico a partir da decapitação das fêmeas em sala silenciosa e no ciclo claro. Todo procedimento de coleta foi realizado em gelo e utilizando material estéril. Após a retirada do encéfalo foram isolados: BO, HPT, CPF e HPC.

As amostras do hemisfério esquerdo foram armazenadas em tubos de 1,5mL contendo RNA *Later* (Ambion) (1:1, v/v) durante 24 horas à 4°C. Transcorrido esse período, o RNA *Later* foi removido e o tecido armazenado à -80°C até a extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA) (MOURA *et al.* 2014).

4.7 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA foi extraído do BO (n=6-8), HPT (n=6-8), CPF (n=5-8) e HPC (n=4-11) utilizando o reagente Trizol (*Invitrogen*, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

O tecido foi homogeneizado em 1mL de Trizol. Às amostras foram adicionados 200µL de clorofórmio (1:5 em relação ao volume inicial de Trizol). Em seguida, as amostras foram agitadas e centrifugadas durante 15 minutos, a 12000xg, a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o RNA foi precipitado através da adição de isopropanol (1:1 do volume da fase aquosa

obtida); as amostras foram então agitadas por 15 segundos. Após, as amostras foram centrifugadas a 12000xg, por 10 minutos, a 4°C; o *pellet* contendo RNA foi lavado em etanol 75%, seco e ressuspendido em 50µL de água tratada com 0,1% de dietilpicrocarbonato (DEPC). O conteúdo de RNA de cada amostra foi quantificado por espectrofotometria e, em seguida, o material foi armazenado a -80°C ou imediatamente utilizado nas reações de RT-PCR (LANGNAESE *et al.* 2008).

4.8 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR)

Os cDNAs foram sintetizados por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante da M-MLV *Reverse Transcriptase* (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Cada reação de síntese da primeira fita de cDNA, contendo 1µg de RNA total, 1µL de oligo(dt)(0,5µg/µL), 1µL de 10mM dNTPs e água tratada com DEPC para um volume final de 12µL, foi incubada a 65°C por 5 minutos e, após, mantida em gelo por pelo menos um minuto. Em seguida, foram adicionados os seguintes componentes para volume final de 19µL: 4µL do tampão da enzima, 2µL de 0,1M DTT, 1µL de RNaseOUT (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Após incubação a 37°C por 2 minutos, foi adicionado 1µL (200 unidades) de M-MLV-RT e então a síntese da primeira fita de cDNA ocorreu a 50°C por 1 hora e, em seguida, a reação foi incubada a 70°C por 15 minutos.

Os *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos de cDNA específicos para os receptores de OT (OTR), AVP (AVPR_{1a}), DOPA (DOPAR_{D2}) EST (ER α e ER β), foram desenhados com base na sequência nucleotídica do RNAm para cada receptor, obtida do *Gen Bank*. A especificidade dos *primers* foi

verificada usando a ferramenta de busca *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para coleção de nucleotídeos (nr) do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A sequência de *primers* usados para os receptores de interesse (OTR, AVPR_{1a}, DOPAR_{D2}, ER α e ER β) estão descritas na Tabela 1 e a sequência de *primers* usados como genes referência (DE MOURA *et al.*, 2014) estão descritos na Tabela 2.

A amplificação dos genes OTR, DOPAR_{D2}, ER α e ER β , bem como para os genes de referência, foi realizada usando 7,5 μ L de *SYBR[®]green polymerase chain reaction (PCR) mastermix* (*Applied Biosystems*, São Paulo, Brasil), 0,5 μ L de *primers forward e reverse* (0,33 μ M cada), 100ng de cDNA e água livre de nuclease, em um volume total de 15 μ L.

Sondas Taq Man[®] foram utilizadas para a amplificação do gene do AVPR_{1a} e para os genes de referência deste receptor. Este protocolo inclui, para um volume final de 15 μ L de *mastermix* (*Applied Biosystems*, São Paulo, Brasil) 1x0,5 μ L de *primers forward e reverse* (900nM), *sonda 1* (200nM) e *sonda 2* (100nM) e uma concentração de cDNA de aproximadamente 100ng. As reações foram feitas em uma placa óptica de 96 poços, usando um termociclador *Step One Plus[™]* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Após o passo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, a amplificação foi realizada em 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, com anelamento de 60°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos. A amplificação foi seguida por uma análise de curva de fusão para confirmar a especificidade do produto do PCR. Nenhum sinal foi detectado nos controles sem molde (*no-template*). O limiar do ciclo (Ct) experimental foi calculado usando os algoritmos de realce fornecidos pelo equipamento. Todas as amostras foram processadas em duplicata, e o valor

médio de cada duplicata foi usado para todos os cálculos restantes. A técnica utilizada está de acordo com Langnaese *et al.*, (2008); Cook *et al.* (2010) e Nelissen *et al.* (2010).

A expressão gênica de cada receptor foi calculada a partir da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este cálculo transforma os dados logarítmicos de Ct em um valor linear. A fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descreve, de modo mais preciso, a variação individual entre as reações de amplificação (CLIPPERTON *et al.*, 2012). Conseqüentemente, o *Norm Finder* requer a transformação de valores de Ct em quantidades de expressão numa escala linear, de forma que os valores médios de Ct foram então exportados para Microsoft Excel e alterados para a forma $2^{-\Delta\Delta Ct}$, e depois as quantidades calculadas foram colocadas no *Norm Finder* (<http://moma.dk/normfinder-software>).

Tabela 1: Sequências dos *primers* dos receptores estudados.

RECEPTORES	SEQUÊNCIA DO PRIMER	
OCITOCINA	LEFT	5' - CGA TTG CTG GGC GGT CTT CA- 3'
	RIGHT	5' - CCG CCG CTG CCG TCT TGA G- 3'
VASOPRESSINA _{1a}	LEFT	5' - TGG TCC GTG ATT GAA AAC CCA- 3'
	RIGHT	5' - CCT TCT GTC TGT TGG TGA GCA- 3'
ESTRÓGENO α	LEFT	5' - CAA GAA CGT TGT GCC CCT CT- 3'
	RIGHT	5' - TGT AAG GAA TGT GCT GAA GTG GA- 3'
ESTRÓGENO β	LEFT	5' - GGG ACA TGT ACC CTA GCA TCG- 3'
	RIGHT	5' - TGG AAA GTA CAA CGA GAG CCT- 3'
DOPAMINA _{D2}	LEFT	5' - CTC AGG AGC TGG AAA TGG AG- 3'
	RIGHT	5' - CAT GCC CAT TCT TTT CTG GT- 3'

Tabela 2: Sequências dos *primers* dos genes de referência (genes constitutivos).

GENES DE REFERÊNCIA	SEQUÊNCIA DO PRIMER	
β-ACTINA	LEFT	5' - TAT GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG- 3'
	RIGHT	5' - TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC AT- 3'
CICLOFILINA A	LEFT	5' - TAT CTG CAC TGG CAA GAC TGA GTG- 3'
	RIGHT	5' - CTT CTT GCT GGT CTT GCC ATT CC- 3'

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do registro comportamental, expressão gênica e síntese de mRNA foram expressos pela média e erro padrão da média (\pm EPM). Foram comparados entre WT e OTKO por teste de Mann-Whitney, pois os dados de todos os parâmetros não apresentaram uma distribuição normal. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

A tabela 3 mostra os resultados do comportamento sexual de camundongos fêmeas WT e OTKO. O grupo OTKO apresentou aumento significativo da latência ($P=0,001$) e diminuição significativa da frequência ($P=0,002$) e da duração ($P=0,002$) do comportamento sexual quando comparado a fêmeas WT. Em relação às posturas não receptivas, fêmeas OTKO apresentaram diminuição significativa da latência ($P=0,001$) e aumento significativo da frequência ($P=0,001$) e da duração destas posturas ($P=0,001$), quando comparadas ao grupo WT.

Tabela 3: Comportamento sexual de camundongos fêmeas.

Parâmetros Comportamentais	WT (n=11)	OTKO (n=11)	P
Frequência das montas	23,3 ± 3,0	14,5 ± 4,3	0,07
Latência da lordose (s)	490,8 ± 113,8	841,9 ± 53,9	0,01 *
Frequência da lordose	6,2 ± 2,3	0,5 ± 0,4	0,02 *
Duração da lordose (s)	49,2 ± 19,9	7,1 ± 7,0	0,02 *
Quociente de lordose	30,0 ± 11,6	2,8 ± 2,6	0,02 *
Latência posturas não receptivas (s)	73,69 ± 11,36	25,77 ± 8,72	0,01 *
Frequência posturas não receptivas	9,53 ± 3,66	35,62 ± 12,14	0,01 *
Duração posturas não receptivas (s)	39,69 ± 13,57	134,90 ± 40,43	0,01 *

Os dados foram expressos por média [\pm EPM]. Mann-Whitney (Teste U de Mann-Whitney). * diferença em relação ao grupo WT.

A tabela 4 apresenta os dados referentes a locomoção das fêmeas. Podemos observar que não houve diferença significativa na locomoção entre os grupos estudados nos parâmetros latência (s) (WT: $4,46 \pm 1,56$ – OTKO: $4,53 \pm 1,45$; $P=0,957$), frequência (WT: $37,23 \pm 10,20$ – OTKO: $30,77 \pm 9,02$; $P=0,129$) e duração (s) (WT: $545,10 \pm 168,90$ – OTKO: $591,50 \pm 116,00$; $P=0,521$).

Tabela 4: Locomoção em camundongos fêmeas.

Parâmetros de locomoção	WT (n=11)	OTKO (n=11)	P
Latência (s)	$4,46 \pm 1,56$	$4,53 \pm 1,45$	0,957
Frequência	$37,23 \pm 10,20$	$30,77 \pm 9,02$	0,129
Duração (s)	$545,10 \pm 168,90$	$591,50 \pm 116,0$	0,521

Os dados foram expressos por média [\pm EPM]. Mann-Whitney (Teste U de Mann-Whitney). * diferença em relação ao grupo WT.

A figura 3 apresenta os resultados da expressão gênica do OTR em diferentes áreas do SNC de camundongos fêmeas. Podemos observar que fêmeas OTKO apresentaram diminuição significativa da expressão gênica deste receptor no HPC ($p=0,05$) em relação ao grupo WT. Nas demais estruturas, BO ($p=0,382$), HPT ($p=0,730$) e CPF ($p=0,536$), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados.

RECEPTOR DE OCITOCINA

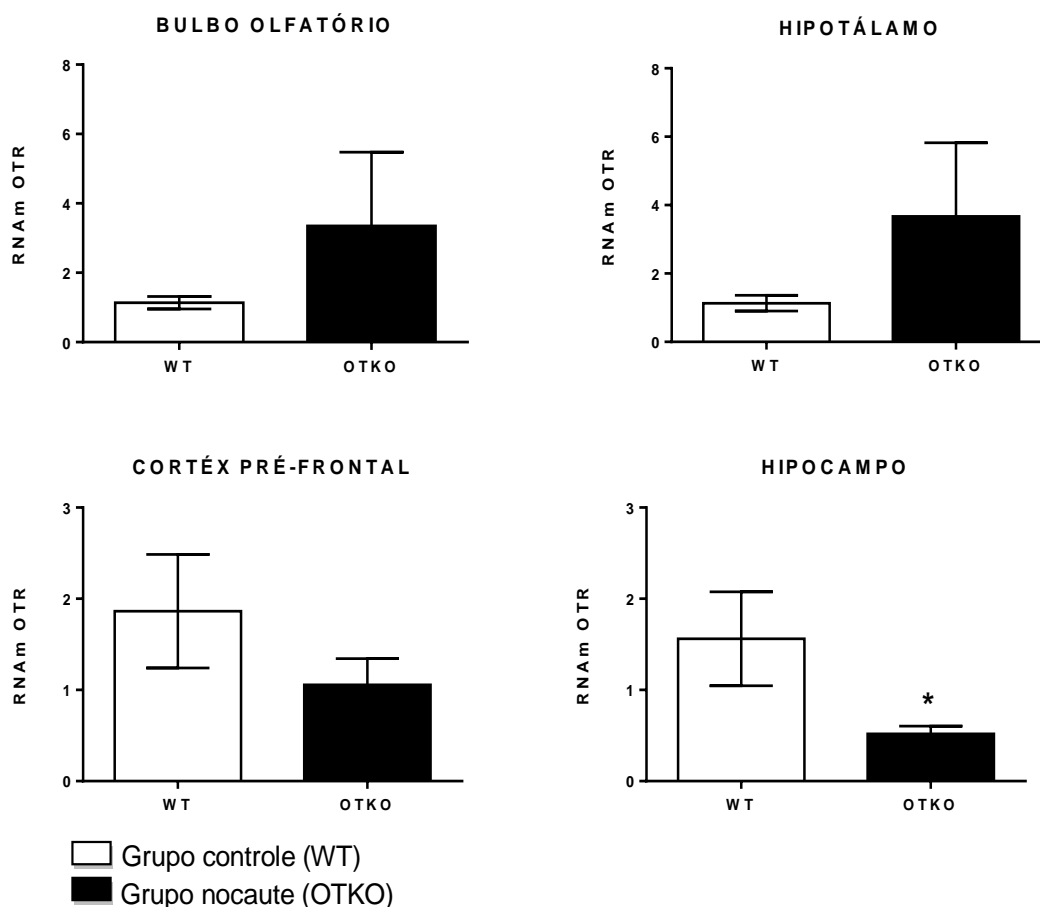


Figura 3. Quantificação relativa da expressão gênica do receptor de ocitocina no sistema nervoso central de fêmeas controle (WT, n=7-8) e nocaute para o gene da OT (OTKO, n=6-10). Os dados foram expressos por média \pm EPM]. Mann-Whitney (Teste U de Mann-Whitney). * diferença em relação ao grupo WT.

A figura 4 apresenta a análise da expressão gênica do AVPR_{1a} em diferentes áreas do SNC de camundongos fêmeas e mostra que fêmeas OTKO apresentaram diminuição significativa da expressão gênica deste receptor no HPT ($P=0,017$), e aumento no HPC ($P=0,008$) quando comparadas ao grupo WT. Não foram encontradas diferenças significativas no CPF ($P=0,150$) e no BO ($P=0,390$) entre os grupos WT e OTKO.

RECEPTOR DE VASOPRESSINA

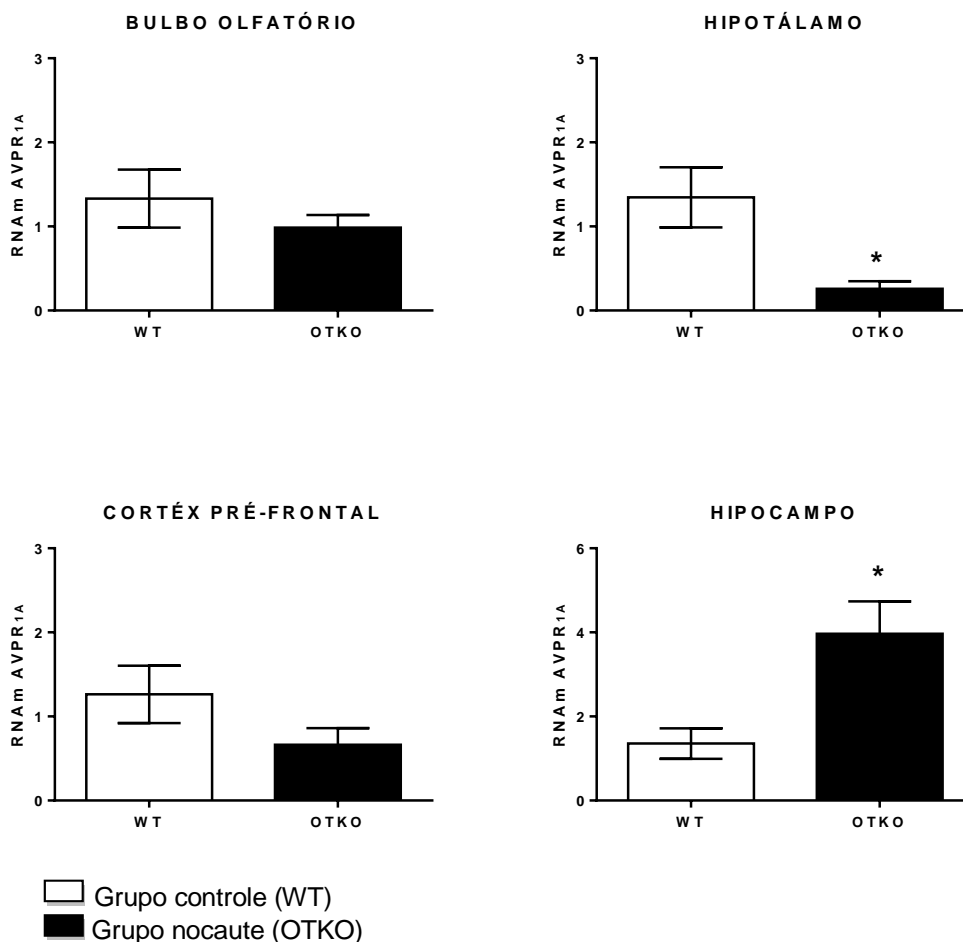


Figura 4. Quantificação relativa da expressão gênica do receptor de vasopressina no sistema nervoso central de fêmeas controle (WT, n=5-11) e nocaute para o gene da OT (OTKO, n=7-11). Os dados foram expressos por média $[\pm EPM]$. Mann-Whitney (Teste U de Mann-Whitney). * diferença em relação ao grupo WT.

A figura 5 apresenta a análise da expressão gênica do receptor do $ER\alpha$ em diferentes áreas do SNC de camundongos fêmeas. É possível observar que fêmeas OTKO apresentaram diminuição significativa da expressão gênica deste receptor no CPF ($P=0,026$) quando comparadas ao WT. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados no HPT ($P=0,600$), BO ($P=0,730$) e HPC ($P=0,359$).

RECEPTOR DE ESTRÓGENO α

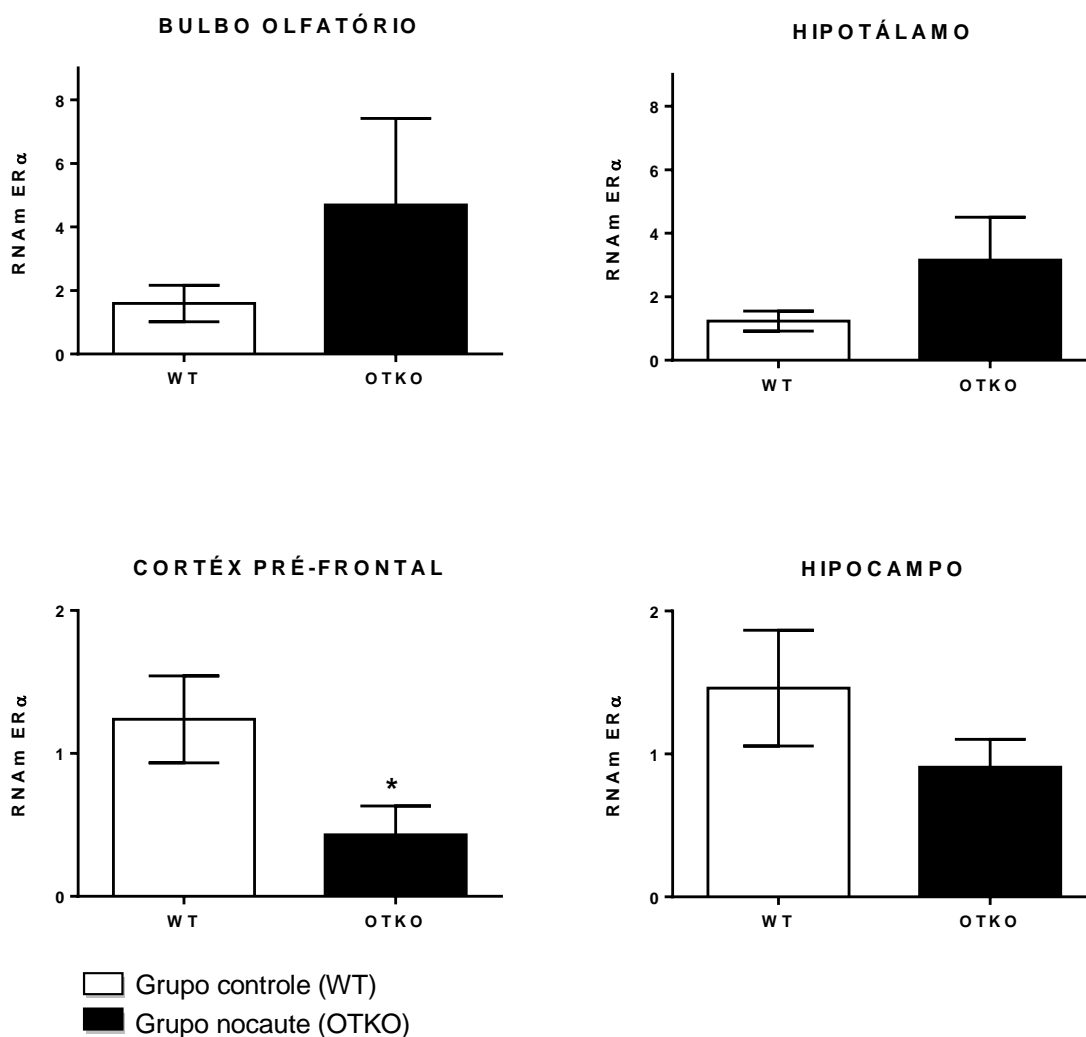


Figura 5. Quantificação relativa da expressão gênica do receptor estrógeno α no sistema nervoso central de fêmeas controle (WT, n=7-8) e nocaute para o gene da OT (OTKO, n=6-10). Os dados foram expressos por média \pm EPM]. Mann-Whitney (Teste U de Mann-Whitney). * diferença em relação ao grupo WT.

A figura 6 mostra que fêmeas OTKO apresentaram diminuição significativa da expressão gênica do ER β apenas no CPF ($P=0,020$) quando comparadas ao controle. Porém, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados no BO ($P=0,662$), HPT ($P=0,612$) e HPC ($P=0,896$).

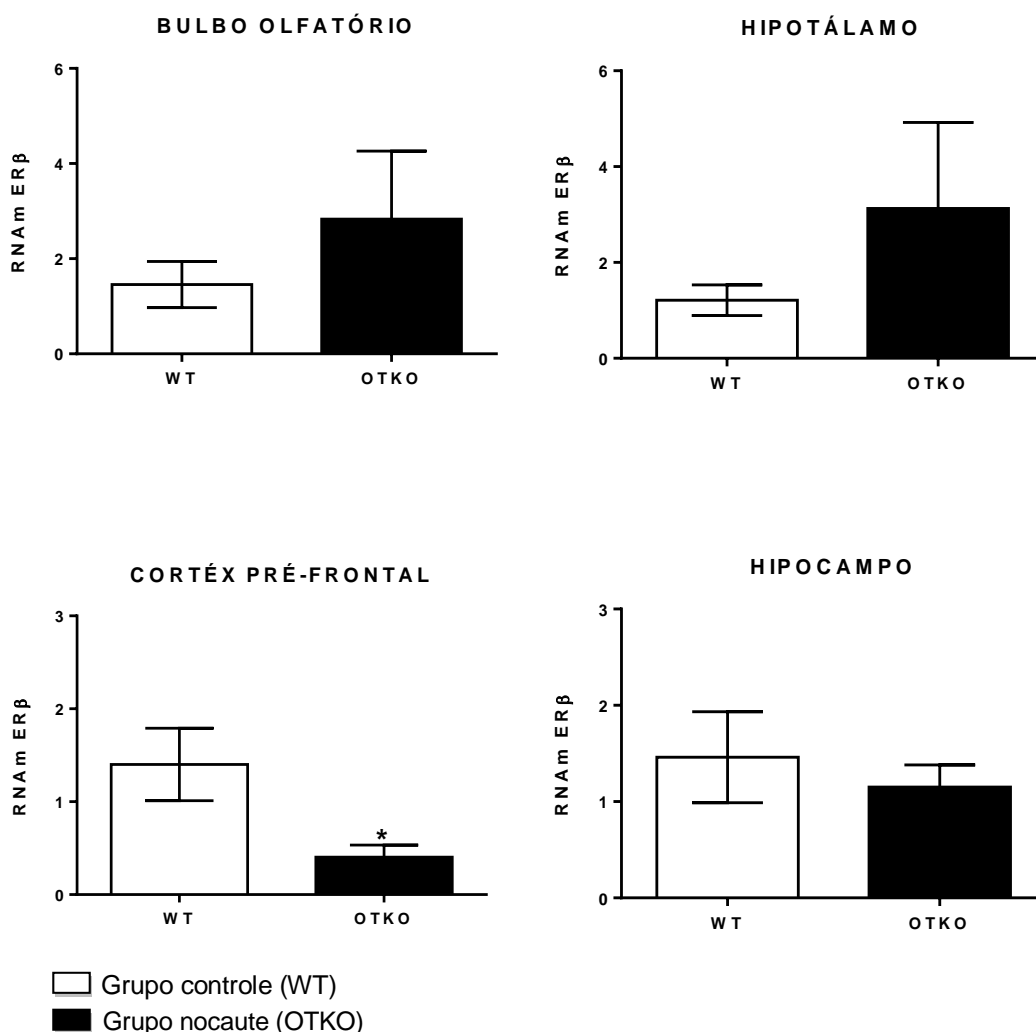
RECEPTOR DE ESTRÓGENO β 

Figura 6. Quantificação relativa da expressão gênica do receptor de estrógeno β no sistema nervoso central de fêmeas controle (WT, n=7-8) e nocaute para o gene da OT (OTKO, n=6-10). Os dados foram expressos por média \pm EPM]. Mann-Whitney (Teste U de Mann-Whitney). * diferença em relação ao grupo WT.

A figura 7 mostra que não há diferença significativa na expressão gênica do DOPAR_{D2} em nenhuma das estruturas estudadas [BO ($P=0,328$), HPT ($P=0,778$), CPF ($P=0,179$) e HPC ($P=0,516$)] quando comparamos os grupos WT e OTKO.

RECEPTOR DE DOPAMINA

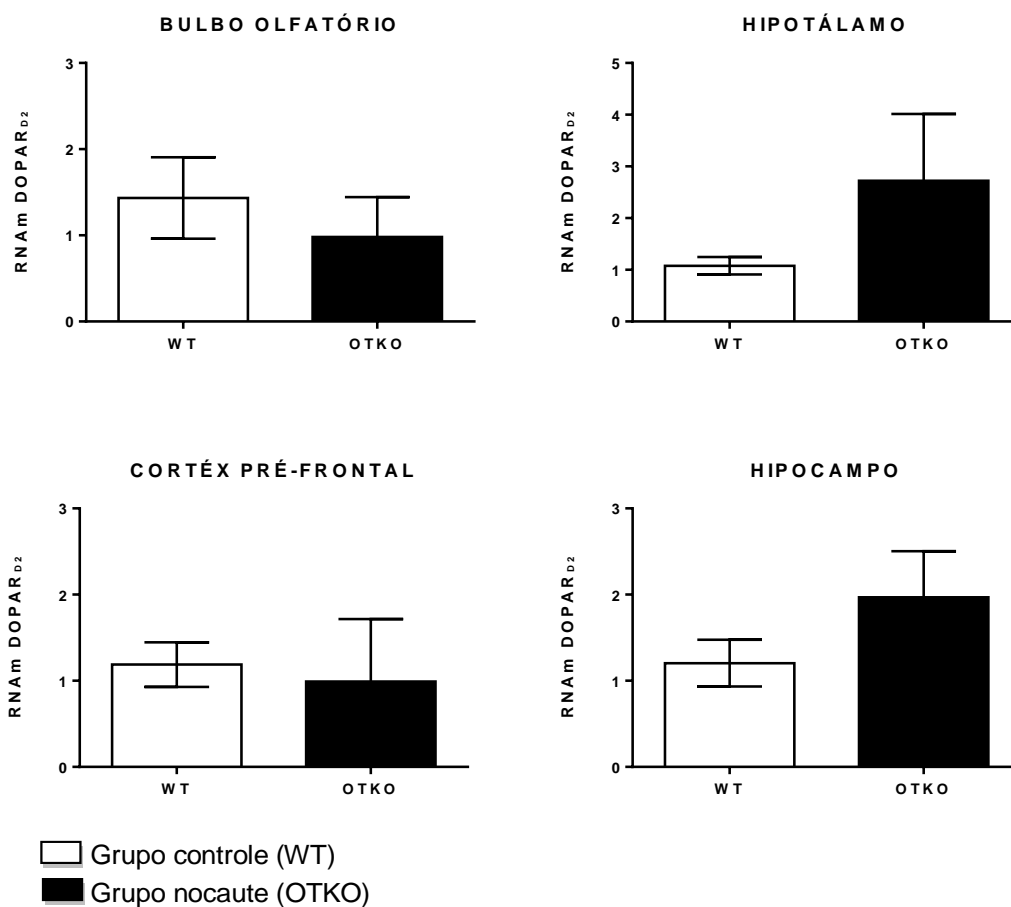


Figura 7. Quantificação relativa da expressão gênica do receptor de dopamina no sistema nervoso central de fêmeas controle (WT, n= 6-8) e nocaute para o gene da OT (OTKO, n=6-10). Os dados foram expressos por média [±EPM]. Mann-Whitney (Teste U de Mann-Whitney). * diferença em relação ao grupo WT.

A figura 8 demonstra que o nocauteamento no gene da ocitocina não promoveu diferença significativa ($P=0,748$) na síntese de RNAm de AVP no HPT de fêmeas OTKO quando comparamos os grupos WT.

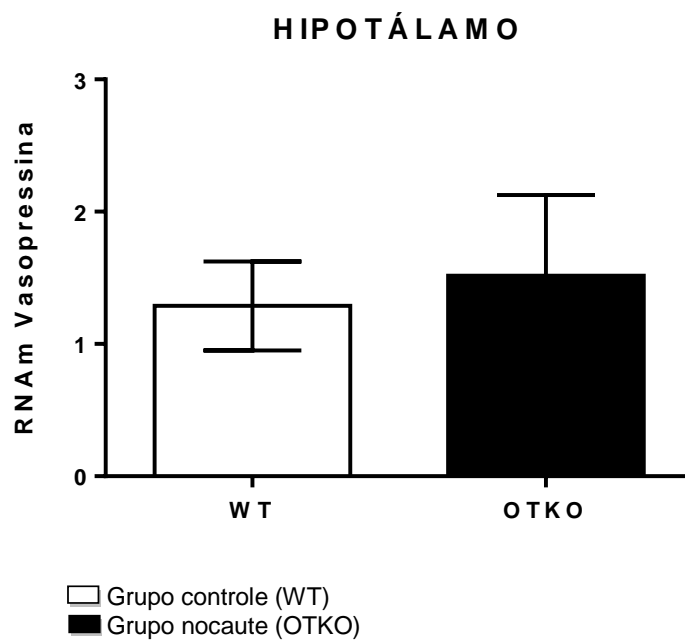


Figura 8. Quantificação relativa da síntese de RNAm de vasopressina no hipotálamo de fêmeas controle (WT, n=8) e nocaute para o gene da OT (OTKO, n=8). Os dados foram expressos por média [±EPM]. Mann-Whitney (Teste U de Mann-Whitney). * diferença em relação ao grupo WT.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Estudos que identificam genes envolvidos no comportamento sexual de fêmeas são de crucial importância, pois estes resultados sugerem caminhos moleculares que modulam a circuitaria cerebral do comportamento reprodutivo.

Recentemente, mostrou-se que o comportamento sexual de camundongos machos não foi afetado pela ausência de OT (LAZZARI *et al.*, 2013). Por outro lado, nossos resultados confirmam os achados de Becker *et al.* (2013) que demonstraram que o nocauteamento do gene da OT diminuiu notavelmente o comportamento sexual de camundongos fêmeas. Nossos resultados também demonstraram aumento significativo da frequência e duração das posturas não-receptivas do grupo OTKO quando comparado ao grupo WT.

A OT parece ser necessária para a fêmea estabelecer a preferência por seu parceiro (BEAR, 2008). Em estudos com ratas, durante a sua primeira experiência sexual, a administração periférica de OT aumentou o comportamento afiliativo (HOLLEY *et al.*, 2015). Os comportamentos afiliativos têm sido descritos como uma forma de manter e estabelecer a relação social. Este comportamento pode estar relacionado ao repertório de corte, de uma forma indireta, atuando como redutor de tensão e também como sinalização de interesse pelo parceiro (BARBOSA *et al.*, 2010). Para Becker *et al.* (2013), a OT está significativamente envolvida no comportamento sexual de fêmeas, um modulador essencial do comportamento de lordose. Sendo assim, nossos resultados corroboram esses achados, pois o nocauteamento do gene da OT, além de diminuir o comportamento sexual de fêmeas, aumentou as posturas não-receptivas quando comparadas ao grupo WT.

Outro aspecto a ser destacado dos nossos resultados é o impacto do déficit

de OT na expressão gênica dos diferentes receptores no SNC. Em relação à expressão gênica dos receptores OTR, observamos apenas uma diminuição no HPC das fêmeas OTKO em relação às fêmeas WT. Em roedores, sabe-se que o HPC é essencial para que o animal reconheça outro da mesma espécie (HITTI & SIEGELBAUM, 2014). Segundo o trabalho de Ferguson *et al.* (2000), camundongos OTKO não conseguiram desenvolver memória social quando comparados a camundongos WT. A administração de OT no grupo OTKO reverteu o déficit de memória social e, o tratamento com um antagonista de OT, produziu um efeito semelhante à amnésia social no grupo WT. Nossos estudos corroboram a hipótese de que a expressão adequada do OTR no HPC é fundamental para o reconhecimento do parceiro, bem como, para o desenvolvimento normal da memória social e do comportamento reprodutivo.

Outro peptídeo que participa da modulação dos comportamentos sociais é a AVP e, nossos resultados mostraram menores níveis de expressão dos receptores AVPR_{1a} no HPT, mas aumento no HPC de fêmeas OTKO quando comparadas a WT. Em roedores fêmeas, a estimulação elétrica da área pré-óptica hipotalâmica interrompe o reflexo lordose, principal componente receptivo, mas sem interferir no componente da proceptividade (CHRISTENSEN *et al.*, 2015; SAKUMA, 2015). Estudos farmacológicos indicam que a administração AVP pode melhorar a memória social (FERGUSON *et al.*, 2000) e que a formação de pares pode ser significativamente modificada por uma pequena alteração na expressão de receptores de AVPR no SNC (BEAR, 2008).

Ademais, estudo prévio (HITTI & SIEGELBAUM, 2014) descreveu elevado nível de expressão gênica do AVPR na região hipocampal e a importância da AVP na motivação sexual. Além disso, a AVP exerce um papel modulador na

excitabilidade do HPC através dos receptores AVPR_{1a} e AVPR_{1b} (ZHANG & HERNÁNDEZ, 2013) e a sinalização para a formação de pares é mediada pelos AVPR_{1a} (BARRETT *et al.*, 2013).

Em roedores machos juvenis, experimentos que promovem a diminuição na densidade de AVPR_{1a} na área estriatal-palidal ventral, levam a prejuízos significativos na preferência por um parceiro (BARRETT *et al.*, 2013). Os resultados deste trabalho podem inferir que a dificuldade em reconhecer o parceiro, a falta da motivação e a diminuição do comportamento sexual nas fêmeas OTKO podem também estar associados à diminuição da expressão gênica do AVPR_{1a} no HPT e aumento da expressão deste receptor no HPC.

Em relação ao CPF, nossos achados são inéditos, pois apresentam a OT modulando a expressão gênica dos receptores ER α e ER β no CPF de fêmeas e associando esta expressão com o comportamento sexual, uma vez que a literatura descreve apenas influência da flutuação periférica dos hormônios gonadais e o aumento da expressão de OT e de seus receptores no SNC (SOMPONPUN & SLADEK, 2003; SUZUKI & HANDA, 2005). O comportamento sexual é dirigido por uma interação sofisticada entre as ações de hormônios esteroides no cérebro que dão origem ao estado de recompensa sexual (PFAUS *et al.*, 2001). Análises de neuroimagem, em modelos animais e humanos, sugerem que o recrutamento de redes neurais motoras seja parte integradora do comportamento sexual (SCHECKLMANN *et al.*, 2015). O CPF é extremamente plástico e regiões pré-frontais frequentemente respondem de forma muito diferente para a mesma experiência, pois a plasticidade no CPF parece ser diferente quando comparada com outras regiões corticais (KOLB & GIBB, 2015). Vários estudos comportamentais em humanos e animais sugerem que a

reposição com EST aperfeiçoa tarefas que são dependentes do CPF (KEENAN *et al.*, 2001; SOLIS-ORTIZ & MARQUEZ-RANGEL, 2001; RAPP *et al.*, 2003). Estudos comportamentais em primatas indicam que o EST pode alterar a organização sináptica e melhorar o desempenho em tarefas cognitivas no CPF (TANG *et al.*, 2004). Davis *et al.* (2010) concluem que animais com lesões no CPF medial não têm a capacidade de suprimir busca de recompensa sexual em face de consequências aversivas. Em nossos experimentos, o modelo OTKO provocou a diminuição da expressão gênica do ER α e ER β no CPF quando comparadas a fêmeas WT.

Por outro lado, não observamos diferenças significativas na expressão gênica do DOPAR_{D2} no BO, HPT, CPF ou HPC de fêmeas OTKO quando comparamos com o grupo WT. O DOPAR_{D2} tem sido implicado na modulação do comportamento sexual, mas o seu papel parece bastante complexo e controverso (FABRE-NYS *et al.*, 2003). Os resultados de Triana-Del Rio *et al.* (2015) demonstraram que a administração de OT com um agonista D₂ (quinpirole), em ratos machos, promoveu a preferência sexual por um parceiro masculino, enquanto que ratos não tratados com OT e/ou agonista D₂, exibiram preferência pelo sexo feminino. Triana-Del Rio *et al.* (2015) também analisaram o tamanho de regiões de dimorfismo sexual, a área pré-óptica e o SON, chegando a conclusão que a preferência por indivíduos do mesmo gênero não se correlaciona com alterações morfológicas nessas estruturas. Sanna *et al.* (2015) estudaram os padrões distintos do comportamento sexual de ratos de linhagens romanas e correlacionaram as diferenças na atividade do sistema dopaminérgico mesolímbico com a motivação e o desempenho sexual copulatório. Em amostras obtidas a partir do núcleo accumbens, o aumento nas

concentrações de DOPA e do seu principal metabólito, o ácido 3,4-dihidroxifenilacético, foi significativamente diferente frente ao desempenho sexual desses ratos. Através de análises bioquímicas e comportamentais, estes estudos direcionam para a visão de que os diferentes padrões sexuais das linhagens de ratos romanos são pelo menos em parte, devido à funcionalidade mais robusta do sistema dopaminérgico mesolímbico (SANNA *et al.*, 2015). Esses achados salientam a importância do sistema dopaminérgico no comportamento sexual. Em contraponto, os nossos trabalhos sugerem que apesar da DOPA alterar o comportamento sexual, não há modificações na expressão de DOPAR_{D2}.

Um aspecto interessante do nosso estudo que deve ser destacado é o fato do nocauteamento no gene da OT não promover nenhuma diferença na síntese de AVP no HPT nas fêmeas OTKO em relação ao grupo WT, embora dois estudos já houvessem demonstrado que os níveis de transcrição da AVP são reduzidos no PVN e SON de camundongos OTKO (YOUNG *et al.*, 1996; OZAKI *et al.*, 2004). No estudo de Becker *et al.* (2013) foi dosado os níveis plasmáticos basais de AVP em fêmeas OTKO e WT, contudo não foi encontrada diferença significativa. Nossos resultados vão ao encontro dos achados de Becker *et al.* (2013), uma vez que a concentração central AVP também não foi afetada em fêmeas OTKO quando comparadas a WT.

Para estudar o comportamento social, diversas abordagens são utilizadas, incluindo ensaios de expressão gênica. Desta forma, estudos (DRIESSEN *et al.*, 2014) vêm utilizando RT-PCR, através da quantificação relativa de RNAm, para analisar a expressão gênica no SNC. No entanto, uma

limitação inerente do nosso estudo é que nós avaliamos a expressão de RNAm dos receptores, e não a proteína traduzida. Nossas principais descobertas nos permitem inferir que a diminuição do comportamento de lordose e o aumento das posturas não-receptivas foram influenciados pela ausência central e periférica da OT. Além disso, podemos associar a ausência da OT circulante com as alterações observadas na expressão gênica do OTR (HPC), AVPR_{1a} (HTP e HPC), ER α (CPF) e ER β (CPF). Desta forma, concluímos que a ausência da OT circulante e a importante variação na expressão dos genes estudados (OTR, AVPR_{1a}, ER α e ER β) no SNC, em conjunto possam explicar a profunda diminuição do comportamental sexual observada nas fêmeas OTKO.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesta tese podemos concluir que:

- A ausência da OT dentro do SNC causou redução dos comportamentos receptivos e aumento dos comportamentos não receptivos das fêmeas OTKO observados na diminuição da performance no teste comportamental;

- Fêmeas OTKO apresentaram uma importante diminuição da expressão dos genes estudados: OTR (HPC), AVPR_{1a} (HPT), ER α e ER β (CPF);

- Fêmeas OTKO apresentaram aumento de AVPR_{1a} no HPC em relação a fêmeas WT;

- O nocauteamento do gene da OT não altera a síntese de AVP no hipotálamo de fêmeas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 Referências Bibliográficas

ACHER R, CHAUVETJ, CHAUVET MT. Man and the chimaera. Selective versus neutral oxytocin evolution. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 395:615-627, 1995.

ADOLPHS R. The social brain: Neural bases of social knowledge. *Annual Review of Psychology* 60:693-716, 2009.

AGGLETON J. The amygdala a functional analysis. *Oxford University Press*, 2000.

AGMO A. Functional and dysfunctional sexual behavior. Elsevier, 2007.

ALBERTS AS, ARIAS J, HAGIWARA M, MONTMINY MR, FERAMISCO JR. Recombinant cyclic AMP response element binding protein (CREB) phosphorylated on Ser-133 is transcriptionally active upon its introduction into fibroblast nuclei. *The Journal of Biological Chemistry* 269:7623-30, 1994.

AMICO JA, MANTELLA RC, VOLLMER RR, LI X. Anxiety and stress responses in female oxytocin deficient mice. *Journal of Neuroendocrinology* 16:319-324, 2004.

ANTUNES IB, DA SILVA A, KAWAKAMI R, ANDERSEN ML. The female rat. In: Andersen ML, Tufik S, editors. *Animal models as tools in ethical biomedical research*, 103–120, 2010.

ARLETTI R, BERTOLINI A. Oxytocin stimulates lordosis behavior in female rats. *Neuropeptides* 6:247-253, 1985.

BADOER E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 28:95-99, 2001.

BALE TL, DAVIS AM, AUGER AP, DORSA DM, MCCARTHY MM. CNS Region-Specific Oxytocin Receptor Expression: Importance in Regulation of Anxiety and Sex Behavior. *The Journal of Neuroscience* 21:2546-2552, 2001.

BALE TL, DORSA DM. Sex differences in and effects of estrogen on oxytocin receptor messenger ribonucleic acid expression in the ventromedial hypothalamus. *Endocrinology* 136:27-32, 1995.

BANNERMAN DM, LEMAIRE M, YEE BK, IVERSEN SD, OSWALD CJ, GOOD MA, RAWLINS JN. Selective cytotoxic lesions of the retrohippocampal region produce a mild deficit in social recognition memory. *Experimental Brain Research* 142:395-401, 2002.

BARBEY AK, KRUEGER F, GRAFMAN J. An Evolutionarily Adaptive Neural Architecture for Social Reasoning. *Trends Neurosci* 32(12):603–610, 2009.

BARBOSA MM, FERREIRA, JM, SANTOS JSC, FERREIRA NS, ALBUQUERQUE ACSR. Comportamento afiliativo de proximidade em animais

reprodutores de saguis, *Callithrix jacchus*, em um grupo com sistema de acasalamento poliândrico, durante a gestação e pós-parto da fêmea dominante. 62ª Reunião Anual da SBPC, 2010.

BARRETT CE, KEEBAUGHA AC, AHERNA TH, BASSD CE, TERWILLIGERD EF, YOUNGA LJ. Variation in vasopressin receptor (Avpr1a) expression creates diversity in behaviors related to monogamy in prairie voles. *Hormones and Behavior* 63 (3):518–526, 2013.

BARTELS A, ZEKI S. The chronoarchitecture of the human brain—Natural viewing conditions reveal a time-based anatomy of the brain. *Neuroimage* 22:419-433, 2004.

BEAR MF, CONNORS BW, PARADISO MA. Neurociências - desvendando o sistema nervoso. *Artmed* 3ªed., 2008.

BECKER JB. Gender Differences in Dopaminergic Function in Striatum and Nucleus Accumbens. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 64(4):803–812, 1999.

BECKER JB n.d. Chapter 3: Hormonal influences on female sex behavior. University of Michigan, *Psychology* 22, 2008.

BECKER RO, LAZZARI VM, MENEZES IC, MORRIS M, RIGATTO K, LUCION AB, RASIA-FILHO AA, GIOVENARDI M. Sexual behavior and dendritic spine density of posterodorsalmedial amygdala neurons in oxytocin knockout female mice. *Behavioural Brain Research* 256(1):95–100, 2013.

BEEN LE, HEDGES VL, VIALOU V, NESTLER EJ, MEISEL RL. Delta JunD overexpression in the nucleus accumbens prevents sexual reward in female Syrian hamsters. *Genes Brain and Behavior* 12(6):666-72, 2013.

BERNATOVA I, RIGATTO KV, KEY MP, MORRIS M. Stress-induced pressor and corticosterone responses in oxytocin-deficient mice. *Experimental Physiology* 89:549-557, 2004.

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. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31:341-358, 2010.

CALDWELL HK, LEE HJ, MACBETH AH, YOUNG III WS. Vasopressin: behavioral roles of an “original” neuropeptide. *Progress in Neurobiology* 84:1-24, 2008.

CALDWELL HK, YOUNG III WS. Oxytocin and vasopressin: genetics and behavioral implications. *Neuroactive Proteins and Peptides* 573-607, 2006.

CALDWELL JD. Central oxytocin and female sexual behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences* 652:166–79, 1992.

CALDWELL JD, PRANGE AJ Jr, PEDERSEN CA. Oxytocin facilitates the sexual

receptivity of estrogen-treated female rats. *Neuropeptides* 7:175-189, 1986.

CALIGIONI CS, OLIVER C, JAMUR MC, FRANCI CR. Presence of oxytocin receptors in the gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurones in female rats: a possible direct action of oxytocin on GnRH neurones. *Journal of Neuroendocrinology* 19(6):439-448, 2007.

CANTERAS NS, SIMERLY RB, SWANSON LW. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 360, 213-230, 1995.

CARMICHAEL MS, HUMBER R, DIXEN J, PALMISANO G, GREENLEAF W, DAVIDSON JM. Plasma oxytocin increases in the human sexual response. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 64:27, 1987.

CARRASCO GA, VAN DE KAR LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology* 463:235-272, 2003.

CARTER CS. The chemistry of child neglect: Do oxytocin and vasopressin mediate the effects of early experience? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:18247-18248, 2005.

CARTER CS, KEVERNE EB. "The Neurobiology of Social Affiliation and Pair Bonding" in *Hormones, Brain, and Behavior*, Academic Press 299–337, 2002.

CHOLERIS E, KAVALIER M, PFAFF W. Functional genomics of social recognition. *Journal of Neuroendocrinology* 16:383-389, 2004.

CHRISTENSEN A, DEWINGAND P, MICEVYCH P. Immediate early gene activity-regulated cytoskeletal-associated protein regulates estradiol-induced lordosis behavior in female rats. *Journal of Neuroscience Research* 93(1):67–74, 2015.

CLASSEN W. Behaviour, Neurology and Electrophysiology. In: KRINKE GJ. (Ed.). *The Laboratory Rat (The Handbook of Experimental Animals)*. Academic Press 419-435, 2000.

CLIPPERTON-ALLEN AE, LEE AW, REYES A, DEVIDZE N, PHAN A, PFAFF DW *et al.* Oxytocin, vasopressin and estrogen receptor gene expression in relation to social recognition in female mice. *Physiology & Behavior* 105(4):915–924, 2012.

CONSIGLIO AR, LUCION AB. Lesion of hypothalamic paraventricular nucleus and maternal aggressive behavior in female rats. *Physiology & Behavior* 59:591-6, 1996.

COOK NL, KLEINIG TJ, VAN-DEN-HEUVEL C, VINK R. Reference genes for normalising gene expression data in collagenase-induced rat intracerebral haemorrhage. *BMC Molecular Biology* 11(7):1-11, 2010.

CUNNINGHAM ET, SAWCHENKO PE. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *Trends in Neuroscience* 14:406-411,1991.

CUNNINGHAM JG. Tratado de fisiologia veterinária. 2ed. Guanabara,1999.

DAVIS JF, LOOS M, DI SEBASTIANO AR, BROWN JL, LEHMAN MN, COOLEN LM. Lesions of the Medial Prefrontal Cortex Abolish Conditioned Aversion Associated with Sexual Behavior in Male Rats. *Biological Psychiatry* 15(67)12:1199–1204, 2010.

DAMÁSIO A. O Erro de Descartes. São Paulo: Cia das Letras, 1996.

DAMÁSIO A. O Mistério da Consciência. São Paulo: Cia das Letras, 2000.

DARWIN C. The Origin of Species. London, John Murray, 1859.

DE MOURA AC, LAZZARI VM, AGNES G, ALMEIDA S, GIOVENARDI M, DA VEIGA ABG. Estudo de expressão transcricional no sistema nervoso central de ratos: qual gene deve ser usado como controle interno? *Einstein* 12(3):336-41, 2014.

DE OLMOS J, BELTRAMINO CA, ALHEID GF. Amydala and extended amydala of therat: cytoarchitectonical, fibroarchitectonical and chemoarchitectonical survey. The Rat Nervous System. *Elsevier Academic Press* 1:509–603, 2004.

DE OLMOS J, HARDY H, HEIMER L. The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: An experimental HRP-study. *The Journal of Comparative Neurology* 181,213-244, 1978.

DE VRIES GJ. Sex differences in vasopressin and oxytocin innervation of the brain. *Progress in Brain Research* 170:17-27, 2008.

DEBIEC J. From affiliative beahviors to romantic feelings: A role of nanopeptides. *FEBS Letters* 581:2580-2586, 2007.

DEVOST D, ZINGG HH.Homo- and hetero-dimeric complex formations of the human oxytocin receptor. *Journal of Neuroendocrinology* 16:372-7, 2004.

DOGTEROM J, VAN-WIMERSMA GT, SWABB DF. Evidence for the release of vasopressin and oxytocin into cerebrospinal fluid: measurements in plasma and CSF of intact and hypophysectomized rats. *Neuroendocrinology* 24:108-118, 1977.

DOMINGUEZ JM, HULL EM. Medial amygdala regulates mating-induced dopamine release in medial preoptic area. *Annals of the New York Academy of Sciences* 985:515-18, 2004.

DRAGO F, PEDERSEN CA, CALDWELL JD, PRANGE JR AJ. Oxytocin potently enhances novelty-induced grooming behavior in the rat. *Brain Research* 368:287–295, 1986.

DRIESSEN TM, EISINGER BE, ZHAO C, STEVENSON SA, SAUL MC, GAMMIE SC. Genes showing altered expression in the medial preoptic area in the highly

social maternal phenotype are related to autism and other disorders with social deficits. *BMC Neuroscience* 15:11, 2014.

EDWARDS D. Induction of estrus in female mice. Estrogen-progesterone interactions. *Hormones and Behavior* 1:299-304, 1970.

ENGELMANN M, WOTJAK CT, EBNER K, LANDGRAF R. Behavioural impact of intraseptally released vasopressin and oxytocin in rats. *Experimental Physiology* 85:125-130, 2000.

ESPERIDIAO-ANTONIO V, MAJESKI-COLOMBO M, TOLEDO-MONTEVERDE D, MORAES-MARTINS G, FERNANDES JJ, ASSIS MB, SIQUEIRA-BATISTA R. Neurobiologia das emoções. *Revista de Psiquiatria Clínica* 35(2):55-65, 2008.

FABRE-NYS C, CHESNEAU D, DE LA RIVA C, HINTON MR, LOCATELLI A, OHKURA S, KENDRICK KM. Biphasic role of dopamine on female sexual behaviour via D2 receptors in the mediobasal hypothalamus. *Europharmacology* 44(3):354-66, 2003.

FERGUSON JN, ADAG JM, INSEL TR, YOUNG LJ. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *Journal of Neuroscience* 21:8278–85, 2001.

FERGUSON JN, YOUNG LJ, HEARN EF, MATZUK MM, INSEL TR, WINSLOW JT. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nature Genetics* 25(3):284-8, 2000.

FERGUSON JN, YOUNG LJ, INSEL TR. The neuroendocrine basis of social recognition. *Frontiers in Neuroendocrinology* 23(2):200–224, 2002.

FERIN M. The menstrual cycle: as integrate view. *Reproductive Endocrinology* 1:103-21, 1996.

FERNÁNDEZ-ESPEJO E. Como funciona o nucleus accumbens? *Revista de Neurología* 30(9):845-849, 2000.

FOURNIER J, STEINBERG R, GAUTHIER T, KEANE PE, GUZZI U, COUDE FX. et al. Protective effects of SR 57746A in central and peripheral models of neurodegenerative disorders in rodents and primates. *Neuroscience* 55, 629-641, 1993.

FRYE CA, RHODES ME. Infusions of 3,5-THP to the VTA enhance exploratory, anti-anxiety, social, and sexual behavior and increase levels of 3,5-THP in midbrain, hippocampus, diencephalon, and cortex of female rats. *Behavioural Brain Research* 187:88-99, 2008.

FUSTER JM. The prefrontal cortex—An update: Time is of the essence. *Neuron* 30, 319–333, 2001.

GIMPL G, FARENHOLZ F. The oxytocin receptor system: structure, function, and

regulation. *Physiological Reviews* 81:629-683, 2001.

GIOVENARDI M, CONSIGLIO AR, BARROS HM, LUCION AB. Pup age and aggressive behavior in lactating rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33(9):1083-8, 2000.

GIOVENARDI M, PADOIN MJ, CADORE LP, LUCION AB. Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. *Physiology and Behavior* 63:351-359, 1998.

GOLDIM JR, RAYMUNDO MM. Pesquisa em saúde e direitos dos animais. *HPCA*, 1997.

GOMEZ CM, FRANTZ PJ, SANVITTO GL, ANSELMO-FRANCI JA, LUCION AB. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32:1239-42, 1999.

GORZALKA BB, LESTER GL. Oxytocin-induced facilitation of lordosis behaviour in rats is progesterone-dependent. *Neuropeptides* 10:55-65, 1987.

HARA Y, BATTEY J, GAINER H. Structure of mouse vasopressin and oxytocin genes. *Molecular Brain Research* 8:319-324, 1990.

HITTI FL, SIEGELBAUM SA. The Hippocampal CA2 Region is Essential for Social Memory. *Nature* 508:88-92, 2014.

HOLLEY A, BELLEVUE S, VOSBERG D, WENZELN K, ROORDA S, PFAUS JG. The role of oxytocin and vasopressin in conditioned mate guarding behavior in the female rat. *Physiology & Behavior* 144(15):7-14, 2015.

INSEL TR, GELHARD R, SHAPIRO LE. The comparative distribution of fore brain receptors for neurohypophyseal peptides in monogamous and polygamous mice. *Neuroscience* 43:623-630, 1991.

JYOTIKA J, MCCUTCHEON J, LAROCHE J, BLAUSTEIN JD, FORGER NG. Deletion of the Bax gene disrupts sexual behavior and modestly impairs motor function in mice. *Developmental Neurobiology* 15:1511-1519, 2007.

KALRA SP, KALRAPS. Neural regulation of luteinizing hormone secretion the rat. *Endocrinology Reviews* 4:311-351, 1983.

KEENAN PA, EZZAT WH, GINSBURG K, MOORE GJ. Prefrontal cortex as the site of estrogen's effect on cognition. *Psychoneuroendocrinology* 26:577-590, 2001.

KIM S-J, YOUNG LJ, GONEN D, VEENSTRA-VANDERWEELE J, COURCHESNE R, COURCHESNE E *et al.* Transmission disequilibrium testing of arginine vasopressin receptor 1A (AVPR1A) polymorphisms in autism. *Molecular Psychiatry* 7:503-507, 2002.

KISS JZ, MARTOS J, PALKOVITS M. Hypothalamic paraventricular nucleus: A quantitative analysis of cytoarchitectonic subdivisions in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 313: 563-573, 1991.

KOLB B, GIBB R. Plasticity in the prefrontal cortex of adult rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9(15):1-11, 2015.

KOLLACK-WALKER S, NEWMAN SW. Mating and agonistic behavior produce different patterns of Fos immuno labeling in the male Syrian hamster brain. *Neuroscience* 66:721-36, 1995.

KOW LM, FLOREA C, SCHWANZEL-FUKUDA M, DEVIDZE N, KAMI KH, LEE A, ZHOU J, MACLAUGHLIN D, DONAHOE P, PFAFF D. Development of a sexually differentiated behavior [lordosis] and its underlying CNS arousal functions. *Current Topics Developmental Biology* 79:37-59, 2007.

KOW LM, PFAFF DW. Mapping of neural and signal transduction pathways for lordosis in the search for estrogen actions on the central nervous system. *Behavioural Brain Research* 92:169–80,1998.

LANG RE, HEIL JWE, GANTEN D, HERMANN K, UNGER T, RASCHER W. Oxytocin unlike vasopressin is a stress hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 37:314-316, 1983.

LANGNAESE K, JOHN R, SCHWEIZER H, EBMEYER U, KEILHOFF G. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat as physical cardiac arrest model. *BMC Molecular Biology* 9:53, 2008.

LAZZARI VM, BECKER RO, AZEVEDO MS, MORRIS M, RIGATTO K, ALMEIDA S, et al. Oxytocin modulates social interaction but is not essential for sexual behavior in male mice. *Behavioural Brain Research* 244:130–6, 2013.

LECKMAN JF, GOODMAN WK, NORTH WG, CHAPPELL PB, PRICE LH, PAULS DL, ANDERSON GM, RIDDLE MA, MCSWIGGAN HM, MCDOUGLE CJ. Elevated cerebrospinal fluid levels of oxytocin in obsessive-compulsive disorder Comparison with Tourette's syndrome and healthy controls. *Archives of General Psychiatry* 51:782-792, 1994.

LEMAIRE M, BOHME GA, PIOT O, ROQUESBP, BLANCHARD GC. CCK-A and CCK-B selective receptor agonists and antagonists modulate olfactory recognition in male rats. *Psychopharmacology* 115,435-340, 1994.

LIM MM, YOUNG LJ. Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. *Hormones and Behavior* 50:506-517, 2006.

LUCION AB, BORTOLINI MC. Mother–Pup Interactions: Rodents and Humans. *Frontiers in Endocrinology* 5:17, 2014.

MACHADO ABM. Neuroanatomia Funcional 2ªed. *Atheneu*, 2006.

MANTELLA RC, VOLLMER RR, LI X, AMICO JA. Female oxytocin-deficient mice display enhanced anxiety-related behavior. *Endocrinology* 144:2291-2296, 2003.

MARCONDES FK, BIANCHI FJ, TANNO AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Brazilian of Journal Biology* 62:609-614, 2002.

MEREDITH M, WESTBERRY JM. Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. *Journal of Neuroscience* 24:5719-5725, 2004.

MESTON CM, FROHLICH PF. The neurobiology of sexual function. *Archives of General Psychiatry* 57:1012-30, 2000.

MELIS MR, ARGIOLAS A. Dopamine and sexual behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 19(1):19-38, 1995.

MICHELINI LC, MARCELO MC, AMICO J, MORRIS M. Oxytocinergic regulation of cardiovascular function: studies in oxytocin-deficient mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 6:284, 2003.

MILLER EK, COHEN JD. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annual Review of Neuroscience* 24:167-202, 2001.

MITCHELL BF, FANG X, WONG S. Metabolism of oxytocin in rat uterus and placenta in late gestation. *Biology of Reproduction* 57:807-812, 1997.

MOHR E, SCHMITZ E, RICHTER D. A single rat genomic DNA fragment encodes both the oxytocin and vasopressin genes separated by 11 kilobases and oriented in opposite transcriptional directions. *Biochimie* 70:649-54, 1988.

MONCHO-BOGANI J, LANUZA E, HERNANDEZ A, NOVEJARQUE A, MARTINEZ-GARCIA F. Attractive properties of sexual pheromones in mice: innate or learned? *Physiology & Behavior* 77:167-176, 2002.

MORRIS M, CALLAHAN MF, LI P, LUCION AB. Central oxytocin mediates stress-induced tachycardia. *Journal of Neuroendocrinology* 7:455-459, 1995.

NELISSEN K, SMEETS K, MULDER M, HENDRIKS JJ, AMELOOT M. Selection of reference genes for gene expression studies in rat oligodendrocytes using quantitative real time PCR. *Journal of Neuroscience Methods* 187(1):78-83, 2010.

NEUMANN ID. Involvement of the brain oxytocin system in stress coping: interactions with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Progress in Brain Research* 139:147-162, 2002.

NISHITANI S, TAKAHIRO M, YASUHIKO K, YASUO S, KAZUYUKI S. Induction of Fos Immunoreactivity in Oxytocin Neurons in the Paraventricular Nucleus After Female Odor Exposure in Male Rats: Effects of Sexual Experience. *Cellular and Molecular Neurobiology* 24(2):283-291, 2004.

OLIET SHR, PIET R. Anatomical Remodelling of supraopticnucleus changes in synaptic and extrasynaptic transmission. *Journal of Neuroendocrinology* 16:303-307, 2004.

OSTROWSKI, NL. Oxytocin receptor mRNA expression in rat brain: implications for behavioral integration and reproductive success. *Psychoendocrinology* 23, 989–1004, 1998.

OZAKI Y, NOMURA M, SAITO J, LUEDKE CE, MUGLIA LJ, MATSUMOTO T *et al.* Expression of the arginine vasopressin gene in response to salt loading in oxytocin gene knockout mice. *Journal of Neuroendocrinology* 16:39–44, 2004.

PFAFF DW, SCHWARTZ-GIBLIN S. Cellular mechanisms of female reproductive behaviors. En: *The Physiology of Reproduction. Raven Press* 1487-1568, 1988.

PFAUS JG, KIPPIN TE, CENTENO S. Conditioning and sexual behavior: a review. *Hormone and Behavior* 2:291–321, 2001.

PEDERSEN CA, BOCCIA ML. Vasopressin interactions with oxytocin in the control of female sexual behavior. *Neuroscience* 139(3):843-851, 2006.

PEDERSEN CA, JOHNS JM, MUSIOL I, PEREZ-DELGADO M, AYERS G, FAGGIN B, CALDWELL JD. Interfering with somatosensory stimulation from pups sensitizes experienced, postpartum rat mothers to oxytocin antagonist inhibition of maternal behavior. *Behavioral Neuroscience* 109(5):980-90, 1995.

PEDERSEN CA, PRANGE AJ. Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America* 76:6661-6665, 1979.

PEREIRA LV. Animais transgênicos: nova fronteira do saber. *Ciência e Cultura* 60:40-42, 2008.

RAPP PR, MORRISON JH, ROBERTS JA. Cyclic estrogen replacement improves cognitive function in aged ovariectomized rhesus monkeys. *The Journal of Neuroscience* 23:5708–5714, 2003.

REVERSI A, RIMOLDI V, MARROCCO T, CASSONI P, BUSSOLATI G, PARENTIM, CHINI B. The oxytocin receptor antagonist atosiban inhibits cell growth via a "biased agonist" mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 280(16):16311-8, 2005.

RIGATTO K, PURYEAR R, BERNATOVA I, MORRIS M. Salt appetite and the renin-angiotensin system: effect of oxytocin deficiency. *Hypertension* 42:793-797, 2003.

RIVAS FJ, MIR D. LA Lesion del nucleo accumbens en las ratas hembra incrementa el rechazo a la monta sin modificar la respuesta de lordosis. *Revista Española de Fisiología* 47(1):1-6, 1991.

RIVEST S, RIVIER C. The role of corticotrophin-releasing factor and interleukin-1 in the regulation of neurons controlling reproductive functions. *Endocrine Reviews* 16:177-99, 1995.

RUSCIO MG, SWEENEY T, HAZELTON J, SUPPATKUL P, SUE CARTER C. Social environment regulates corticotrophin releasing factor, corticosterone and vasopressin in juvenile prairie voles. *Hormones and Behavior* 51:54-61, 2007.

SABATIER N. Alpha-Melanocyte-stimulating hormone and oxytocin: a peptide signalling cascade in the hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology* 18(9):703-10, 2006.

SAKUMA Y. Estradiol-sensitive projection neurons in the female rat preoptic area. *Frontiers in Neuroscience* 9:67, 2015.

SAMSON WK, SCHELL DA. Oxytocin and the anterior pituitary gland. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 395:355-364, 1995.

SANNA F, PILUDUA MA, CORDAA MG, MELISB MR,GIORGIA O, ARGIOLAS A. Involvement of dopamine in the differences in sexual behaviour between Roman high and low avoidance rats: An intracerebral microdialysis study. *Behavioural Brain Research* 281(15):177–186, 2015.

SAUSVILLE E, CARNEY D, BATTEY J. The human vasopressin gene is linked to the oxytocin gene and is selectively expressed in a cultured lung cancer cell line. *Journal of Biological Chemistry* 260:10236–10241, 1985.

SAVONENKO A, FILIPKOWSKI RK, WERKA T, ZIELINSKI K, KACZMAREK L. Defensive conditioning-related functional heterogeneity among nuclei of the rat amygdala revealed by c-Fos mapping. *Neuroscience* 94:723-33, 1999.

SCHECKLMANN M, ENGELHARDT K, KONZOK J, RUPPRECHT R, GREENLEE MW, MOKROS A, LANGGUTH B, POEPPL TB. Sexual motivation is reflected by stimulus-dependent motor cortex excitability. *Social Cognitive Affective Neuroscience*, 2015.

SCHENBERG LC, BITTENCOURT AS, CALDELLAS AV, AL PRADO DA COSTA, PÓVOA RMF. Uma abordagem neuroetológica dos comportamentos de defesa das linhagens Wistar e Selvagem do rato (*Rattus norvegicus*), 2005. Em 'Etologia: uma perspectiva histórica e tendências contemporâneas', editado por Garcia A, Tokumaru RS e Borloti EB, Editora Multiplicidade, Vitória, ES.

SHEEHAN T, PAUL M, AMARAL E, NUMAN M. Evidence that medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nucleus to inhibit maternal behavior in rats. *Neuroscience* 106:341-56, 2001.

SHEPHERD JE. Effects of Estrogen on Cognition, Mood, and Degenerative Brain Diseases. *Journal of American Pharmacists Association* 41(2):221-228, 2001.

SHORR E. A new technic for staining vaginal smears. *Science* 94(2449):545-

6,1941.

SIMPSON ER, DAVIS SR. Another role highlighted for estrogens in the male: Sexual behavior. *National Academy of Sciences of the United States of America* 97(26):14038–14040, 2000.

SLATER PJB. El comportamiento animal. *Cambridge*, 2000.

SOLIS-ORTIZ MS, MARQUEZ-RANGEL R. Effects of estrogen replacement therapy on a decision-making task and depressive symptoms in postmenopausal women. *Society Neuroscience Abstracts* 27:311-10, 2001.

SOMPONPUN S, SLADEK C. Osmotic regulation estrogen receptor- β rat in vasopressin and oxytocin Neurons. *The Journal of Neuroscience* 23:4261-4269, 2003.

SQUIRES AS, PEDDLE R, MILWAY SJ, HARLEY CW. Cytotoxic lesions of the hippocampus do not impair social recognition memory in socially housed rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 85:95-101, 2006.

STUSS DT, BENSON DF. Neuropsychological studies of the frontal lobes. *Psychological Bulletin* 95:3-28, 1984.

SUZUKI S, HANDA RJ. Estrogen receptor-beta, but not estrogen receptor-alpha, is expressed in the prolaction neurons of the female rat paraventricular and supraoptic nucleic: comparison with other neuropeptides. *The Journal of Comparative Neurology* 484:28-42, 2005.

SWANSON LW, PETROVICH GD. What is the amygdala? *Trends in Neurosciences* 21:323-331,1998.

TANG Y, JANSSEN WGM, HAO J, ROBERTS JA, MCKAY H, LASLEY B, ALLEN PB, GREENGARD P, RAPP PR, KORDOWER JH, HOF PR, MORRISON JH. Estrogen Replacement Increases Spinophilin-immunoreactive Spine Number in the Prefrontal Cortex of Female Rhesus Monkeys. *Cereb Cortex* 14 (2):215-223, 2004.

TELLERIA CM, ZHONG L, DEB S, SRIVASTAVA RK, PARK KS, SUGINO N, PARK-SARGE OK, GIBORI G. Differential expression of the estrogen receptors α and β in the rat corpus luteum of pregnancy: regulation by prolaction and placental lactogens. *Endocrinology* 139(5):2432-2442, 1998.

TERRANOVA JP, PERIO A, WORMS P, LE FUR G, SOUBRIE P. Social olfactory recognition in rodents: Deterioration with age, cerebral ischaemia and septal lesion. *Behavioural Pharmacology* 5:90-98, 1994.

TRIANA-DEL RIO AR, TECAMACHALTZI-SILVARÁNA MB, DÍAZ-ESTRADAA VX, HERRERA-COVARRUBIASA D, CORONA-MORALESB AA, PFAUSC JG, CORIA-AVILAA GA. Conditioned same-sex partner preference in male rats is facilitated by oxytocin and dopamine: Effect on sexually dimorphic brain nuclei.

Behavioural Brain Research 283(15):69–77, 2015.

TRIBOLLET E, BARBARIÉS C, DUBOIS-DAUPHIN M, DREIFUSS JJ. Localization and characterization of binding sites for vasopressin and oxytocin in the brain of the guinea pig. *Brain Research* 589:15-23, 1992.

UVNAS-MOBERG, K. Oxytocin mediates the benefits of positive social interactions and emotion. *Psychoneuroendocrinology* 23:819-835,1998.

VEINANTE P, FREUND-MERCIER MJ. Distribution of oxytocin and vasopressin binding sites in the rat extended amygdala: a histoautoradiographic study. *Journal of Comparative Neurology* 383:305-325,1997.

VOISIN DL, SIMONIAN SX, HERBISON AE. Identification of estrogen receptor-containing neurons projecting to the rat supraoptic nucleus. *Neuroscience* 78:215-28, 1997.

WALLNER B, DITTAMI J, MACHATSCHKE I. Social stimuli cause changes of plasma oxytocin and behavior in guinea pigs. *Biological Research* 39:251-258, 2006.

WETTSCHURECK N, MOERS A, HAMALAINEN T, LEMBERGER T, SCHÜTZ G, OFFERMANN S. Heterotrimeric G proteins of the Gq/11 family are crucial for the induction of maternal behavior in mice. *Molecular and Cellular Biology* 24(18):8048-54, 2004.

WITT DM. Oxytocin and rodent socio sexual responses: from behavior to gene expression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 19:315–24, 1995.

WITT DM, INSEL TR. A selective oxytocin antagonist attenuates progesterone facilitation of female sexual behavior. *Endocrinology* 128:3269-76, 1991.

WUNSCH S. Comprendre les origines de la sexualité humaine. Neurosciences, éthologie, anthropologie. *L'Esprit du temps*, 2014.

YOUNG LJ, WANG Z, INSEL TR. Neuroendocrine bases of monogamy. *Trends in Neurosciences* 21:71-75, 1998.

YOUNG III WS, GAINER H. Transgenesis and the study of expression, cellular targeting and function of oxytocin, vasopressin and their receptors. *Neuroendocrinology* 78:185-203, 2003.

YOUNG III WS, SHEPARD E, AMICO J, HENNIGHAUSEN L, WAGNER KU, LAMARCAMU, MCKINNEY C, GINNS. Deficiency in mouse oxytocin prevents milk ejection, but not fertility or parturition. *Journal of Neuroendocrinology* 8:847–53, 1996.

ZHANG L, HERNÁNDEZ VS. Synaptic innervation to rat hippocampus by vasopressin-immuno-positive fibres from the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. *Neuroscience* 228(3):139–162, 2013.

ZINGG HH, LAPORTE SA. The oxytocin receptor. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 14:222-227, 2003.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I – PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

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

Objetivos do Projeto

- Geral: Estudar o papel da ocitocina (OT) na regulação do comportamento sexual e reprodutivo de camundongos machos e fêmeas.

Específicos: Analisar o efeito do deficit de ocitocina no comportamento sexual de camundongos fêmeas e machos;

Analisar as concentrações plasmáticas dos hormônios progesterona, estradiol, luteinizante, foliculo estimulante e prolactina, em machos e fêmeas knockout para ocitocina;

Avaliar o número de oócitos presentes nos ovidutos das fêmeas, bem como a espermatogênese em machos de camundongos knockout para ocitocina;

Estudar o comportamento de memória social e interação social em machos com deficit de ocitocina.

Sumário do Projeto

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.

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
Crêterios 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


Edi C. Pulcinella
 Secretária do CEP/UFCSA

9.2 ANEXO II – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA PHYSIOLOGY & BEHAVIOR

Dear Josi,

Your submission entitled "The impact of oxytocin gene-knockout in sexual behavior and expression of oxytocin, vasopressin, estrogen and dopamine receptors in different areas of the central nervous system of female mice" under article type: Research paper has been received by Physiology & Behavior.

Elsevier Editorial System(tm) for Physiology & Behavior
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: The impact of oxytocin gene-knockout in sexual behavior and expression of oxytocin, vasopressin, estrogen and dopamine receptors in different areas of the central nervous system of female mice

Article Type: Research paper

Keywords: OTKO; female sexual behavior; oxytocin receptor; vasopressin receptor; estrogens receptor; dopamine receptor.

Corresponding Author: Mrs. Josi Maria Zimmermann-Peruzatto, MS

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

First Author: Josi Maria Zimmermann-Peruzatto, MS

Order of Authors: Josi Maria Zimmermann-Peruzatto, MS; Virgínia Meneghini Lazzari, MS; Grasiela Agnes, MS; Roberta Oriques Becker, MS; Silvana Almeida, DR; Márcia Giovenardi, DR

The impact of oxytocin gene-knockout on sexual behavior and expression of oxytocin, vasopressin, estrogen and dopamine receptors in different areas of the central nervous system of female mice

Josi Maria Zimmermann-Peruzatto¹, Virgínia Meneghini Lazzari², Grasiela Agnes², Roberta Oriques Becker², Silvana de Almeida², Márcia Giovenardi^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil

*Correspondence: Msc. Josi Maria Zimmermann-Peruzatto
Rua Sarmiento Leite, 245/308
90050-170 - Porto Alegre, RS, Brasil
Tel. +55-51-9252-8355
e-mail: josimariazp@yahoo.com.br

ABSTRACT

Social relations are built and maintained from the interaction between individuals. Oxytocin (OT), vasopressin (AVP), estrogens (EST), dopamine (DOPA) and their receptors are involved in the modulation of sexual behavior in females. Structures of the central nervous system (CNS), such as the olfactory bulb (OB), hypothalamus (HPT), medial amygdale, prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HPC) have important functions related to sexual motivation, odor recognition, memory, and emotional responses. In mice, OT is essential for lordosis behavior and to establish the female preference for her partner. The experimental model using knockout animals for OT allows evaluating the physiological and behavioral changes generated from this genetic manipulation. This study aimed to analyze the impact of OT gene knockout (OTKO) in sexual behavior of female mice, in the synthesis hypothalamic of AVP and gene expression of OT receptors (OTR), AVP (AVPR_{1a}), EST alpha (ER_α), EST beta (ER_β) and DOPAR_{D2} in OB, HPT, PFC and HPC. We used 11 female mice (C57BL/6J) for the control group (WT) and the same number for the OTKO group. Detection of the transgene in the genome was performed by polymerase chain reaction (PCR) and the animals were classified as: WT (OT+/+), heterozygous (+/-OT) and OTKO (OT-/-). The female sexual behavior test was performed on the evening of proestrus and these behavioral parameters were evaluated: frequency, duration and latency lordosis, frequency of mounts, as well as non-receptive positions. The collection of brain structures (OB, HPT, PFC and HPC) happened the next morning the behavioral test. The cDNAs were synthesized by reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR). The gene expression of each receptor was calculated from the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula. Data from the behavioral record and gene expression were expressed as mean, standard error of the mean (\pm SEM) and analyzed by the Mann-Whitney test. In all cases, $p < 0.05$ was considered statistically significant. Our results showed significant increase in latency and decrease in the frequency and duration of lordosis behavior in OTKO females. For non-receptive postures, OTKO females were significantly reduced latency and increased frequency and duration of these postures. Regarding the gene expression of different receptors, OTKO females showed significant decrease in OTR gene expression only in the HPC compared to WT group. We found that the OTKO group showed a significant decrease in gene expression of AVPR_{1a} only in HPT, but increased expression in HPC when compared to the WT group. Also, OTKO females showed significant decrease in gene expression of ER_α and ER_β only the PFC when compared to the WT group. There were no significant differences in gene expression DOPAR_{D2} in any of the studied structures when comparing the two groups. Regarding knockout in OT gene, our results showed that this does not promote significant difference in AVP mRNA synthesis in HPT of OTKO group when the WT group. Our main findings allow us to infer that the absence of OT within the CNS, as well as a significant changes in expression of the genes studied (OTR, AVPR_{1a}, ER_α and ER_β) mainly in the PFC are related to decreased sexual behavior observed in OTKO females.

Key words: OTKO, vasopressin, estrogens, dopamine, female sexual behavior.

1 INTRODUCTION

The behavior can be regarded as the relationship of the individual with the environment in which he/she/it is located. The different behavioral responses are generally assigned as not social behavior (maintenance or exploitation behavior) or social behavior (reproduction, aggression, submission or escape) [1].

The oxytocin (OT) is identified as a modulator of social behavior [2]. The cell bodies of neurons in the hypothalamic paraventricular nuclei located (PVN) and supraoptic (SON) produce and release neuropeptides OT and vasopressin (AVP) [3], where two populations of neurons ocitocinergic are well highlighted, the magnocellular neurons and parvocellular neurons [4].

Action potentials in neurosecretory cells trigger the release of OT from the axonal terminals in the neurohypophysis into the bloodstream [5]. The OT is also produced in the parvocellular division of the PVN, but in smaller quantities. The neurons in this division are projected to different areas of the brain, such as: amygdala, hippocampus (HPC), hypothalamus (HPT), nucleus accumbens, bed nucleus of the stria terminalis, the spinal cord and others [5;6].

Genes encoding OT and AVP are highly homologous and located on the same chromosome, but opposite transcriptional [7]. The distance between these genes is from 3 to 12 kb in mice [8], humans [9] and rats [10].

Many structures are responsible for appearance and/or maintenance of sexual behavior, among them are: olfactory bulb (OB) [11], HPT [12;13], prefrontal cortex (PFC) [14], HPC [15], striatum, medial amygdala and medial preoptic area [16].

In rodents, the OB is responsible for discriminating a wide variety of odors present in the environment, generating different behaviors [11], including sexual behavior. On the other hand, lordosis behavior depends on the action of sex steroids, as well as on the activation of a neural circuitry which involves HPT [17]. The PFC is responsible for the inhibition of pulses and the major part of the management behaviors that constitute the emotional responses, such as sexual

behavior [18]. Furthermore, studies showed high level of the neuropeptides related to sexual motivation in the HPC [15].

Antunes et al. [19] affirmed that sexual behavior is a result of a complex interaction between neurotransmitters, enzymes, hormones and other proteins, which in harmonious sequence express the mating ability.

The reproductive process is dependent on the role of the OT and AVP [20]. The OT is an important inducer of sexual behavior, arousal and orgasm [21]. In mice deletion of the gene OT (OTKO), in addition to inhibiting of transcription OT decreases the transcription of the gene in the AVP in the SON and PVN [22;23].

In females, the expression of AVP in the brain is smaller than males [24]. The central administration of AVP inhibits sexual behavior of females exposed to a sexually active male [25] and the central administration of an antagonist AVPR_{1a} stimulates sexual receptivity [26]. Evidences suggest that sexual behavioral effects are primarily mediated by specific circuits related to AVPR_{1a} expression in the CNS [27].

The sex steroids may influence oxcitocinergetic and vasopressinergetic neurons, modulating the hypothalamic-pituitary neuro-system [28;29]. In mammals, it is observed that the high concentration of OT and OTR coincides with the high concentration of serum estradiol [30]. According to Voisin et al. [31], there is an expression of ER in the medial preoptic area, which sends projections to the SON, place of OT and AVP synthesis.

In females, the pre-copulatory behavior requires the EST in three ways: increasing the provision of female to approach the male and induce sexual behavior; inducing the production of odors, pheromones and vocalizations that make it the most attractive female and promoting estrogen conversion in progesterone [32]. In mice, the sex that steroids modulate the dopaminergic activity in the striatum and nucleus accumbens [33] may be important for some motor responses during sexual behavior [32].

This study aimed to analyze the impact of OT gene knockout (OTKO) in sexual behavior of female mice with the hypothalamic synthesis of AVP and gene

expression of OT (OTR), AVP (AVPR_{1a}), EST alpha (ER_α), EST beta (ER_β) and DOPAR_{D2} in OB, HPT, PFC and HPC.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals

The mice (C57BL/6) of this study were the offspring of a backcrossed stock obtained from Dr. W. Scott Young (B6; 129S-OxTtm1Wsy/J; NIMH, USA). Female mice [n=11 for control group (WT); n=11 for OTKO group], between 5 and 8 months old, weighing 25 to 35g, were raised in the animal housing facility of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA, Brazil). Female mice of 4 to 5 animals were housed in ventilated transparent acrylic cages (37 cm × 24 cm × 24 cm), controlled temperature (21 ± 1°C) and light (12:12 light-dark cycle with lights off at 5 pm) conditions. The mice had free access to chow (Nuvilab, Brazil) and water. All procedures were performed in conformity with international regulation for the care and use of laboratory animals (National Institutes of Health Publication No. 85-23, reviewed 1985, USA) as well as the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior Guidelines. The protocols were approved by the local Ethics Committee (UFCSPA, Brazil, protocol No. 920/09).

In order to determine the regularity of the estrous cycle, vaginal smears were taken from virgin female mice during 2 weeks before the beginning of the experiment. After three regular estrous cycles, sexual behavior experiments were performed in the beginning of the night of the proestrus phase [34;35].

2.2 Genotyping

The colony founders were developed by Young et al. [22]. The gene was deleted by crossing a genetic construct with the WT mouse OT allele in a manner that replaced the last 2 exons. Genotyping was carried out as previously described [34]. Briefly, genomic DNA was isolated from mouse tail samples and used as template for polymerase chain reaction. The primer sequences for amplification of

the WT alleles involved the forward primer 5'-CTT GGC TTA CTG GCT CTG ACCT-3' and the reverse primer 5'-GTC AAG AGG GAG CCT AAC ACT TC-3'. To amplify the targeted allele, an additional forward primer (NEO) was used: 5'-TGC CCC AAA GGC CTA CCC GCT TCC-3'.

After genotyping, mice were divided into WT and OTKO groups and randomly assigned in two experiments, as follows.

2.3 EXPERIMENT 1

2.3.1 Sexual Behavior

The females WT and OTKO were tested with sexually experienced males, because they exhibited higher frequencies and shorter latencies for the behavioral components of copulation, including mounting, intromission and ejaculation than more experienced males [35]. The male was habituated for 10 minutes in the test apparatus. After the adaptation time, a female was placed in the same observing box and the behavioral test started. The test was performed during the dark cycle in a room illuminated by dim red light, and behaviors were recorded with a video camera during 15 minutes [36].

The following parameters were evaluated: latency, frequency and duration of lordosis behavior. The lordosis response was scored on a 4-point scale (0–3) as described by Hardy and De Bold [37]. For each female mouse, a lordosis quotient was calculated by dividing the number of lordosis scores of 2 or 3 by the total number of mounts x 100. The test was videotaped using a video camera and recorded using the “Observer” software (Noldus®, Holland).

2.4 EXPERIMENT 2

2.4.1 Brain tissue samples

Female mice were decapitated and brains were quickly removed. The OB, HPC, HPT and PFC from the left hemisphere were dissected, with an stereomicroscope, on ice, using sterile materials. Samples were always collected

in the morning, during the light cycle and in a noiseless room.

The structures dissection was performed as previously described and illustrated by Chiu et al. [38], following the coordinates stated in the maps and guides to dissection published by Palkovits [39] and Swanson [40] to separate each specific brain area of interest for the present study. Immediately after dissection, samples were placed in tubes containing RNA-later (1:1, v/v) for 24h at 4°C. After, RNA-later was removed and the tissue stored at -80°C until the RNA extraction.

2.5 MOLECULAR ANALYSES

2.5.1 RNA extraction

Total RNA was extracted from samples using Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brazil), according to manufacturer's guidelines. Briefly, each brain structure was homogenized in the presence of Trizol; chloroform was added (1:5, v/v); and the aqueous phase was obtained after centrifugation (12,000g, 15min). RNA was precipitated with isopropanol for 15min, at room temperature; followed by centrifugation at 12,000g for 10min. Pellets were resuspended in 0.1% DEPC-treated water. The concentration of total RNA was determined by measuring the optical density at 260nm and the RNA purity was assessed based on the 260nm/280nm ratio and agarose gel electrophoresis [41].

2.5.2 cDNA synthesis

Total RNA (1µg) was used as a template to synthesize cDNA. RNA was first incubated with 1µL oligo (dT)(0.5µg/µL, Invitrogen, São Paulo, Brazil) 1µL 10mM dNTPs and DEPC-water to a final volume of 12µL, for 5min at 65°C and then 1min in ice. The following reagents were then added to reach a final volume of 19µL: 4µL RT buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂), 2µL 0.1M DTT, and 1µL RNaseOUT (40U/µL, Invitrogen, São Paulo, Brazil). After a 2-min incubation at 37°C, 1µL M-MLV-RT (200U/µL, Invitrogen, São Paulo, Brazil) was added and cDNA synthesis was performed at 50°C for 1h; the reaction was inactivated by incubation at 70°C for 15min.

2.5.3 Real Time PCR (qPCR)

Table 1 shows all primer sequences used in this study, which were designed using the software Primer-3 [42], based on mice mRNA sequences in the GenBank database [43]. The specificity of the primers was checked using BLAST search against nucleotide collection (nr) of the NCBI database. All primers were from Invitrogen, São Paulo, Brazil.

The amplification for OTR, DOPAR_{D2}, ER α and ER β , as well as for the reference genes [(beta-actin (ActB) and cyclophilin-A (CypA)], was carried out using 7.5 μ L of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, Brazil), 0.5 μ L of forward and reverse primers (0.33 μ M each), 100ng of cDNA and nuclease-free water, in a total volume of 15 μ L. Taqman® probes were used for amplification of the gene AVPR_{1a} and for reference genes of this receptor. This protocol includes, in a final volume of 15 μ L of mastermix (Applied Biosystems, São Paulo, Brazil) 1x0,5 μ L of forward primers and reverse (900nm), probe 1 (200nM) and probe 2 (100nM) and a cDNA concentration approximately 100ng. Reactions were performed in an optical 96-well plate, using a StepOnePlus™ thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). After an initial denaturation step at 95°C for 10min, amplification was performed in 50 cycles of denaturation at 95°C for 30s, annealing at 60°C for 40s and extension at 72°C for 40s. Amplification was followed by a melting curve analysis to confirm PCR product specificity. No signals were detected in non-template controls. The experimental Ct (cycle threshold) was calculated using the algorithm enhancements provided by the equipment. The Ct value of each reaction was used to calculate the level of mRNA expression of that specific gene, after normalizing it in relation to the expression of the control housekeeping (HKG) genes analyzed in parallel in the same reaction plate.

The gene expression of each receptor and HKG were calculated from the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula [44]. All samples were run in duplicate and the mean value of each duplicate was used for all further calculations [41;45;46;47]. These data were analyzed by NormFinder (a Visual Basic application for Microsoft Excel) [41].

2.6 STATISTICAL ANALYSIS

Data of molecular analyses and sexual behavioral test (mean \pm SEM) were

compared by the Mann-Whitney test because the data of all parameters did not show a normal distribution. In all cases, $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3 RESULTS

The OTKO group had a significant increase in the latency ($P=0.001$) and decrease in the frequency ($P=0.002$) and duration ($P=0.002$) of female sexual behavior when compared to WT females (Table 2). For non-receptive postures, OTKO females showed a significant reduction in latency ($P=0.001$) and increased frequency ($P=0.001$) and duration of these positions ($P=0.001$) when compared to the WT group.

Figure 1 shows the results of the OTR gene expression in different areas of the CNS female mice. We can see that OTKO females showed significant decrease in gene expression of this receptor in the HPC ($P=0.05$) compared to WT group. In other structures, OB ($P=0.382$), HPT ($P=0.730$) and PFC ($P=0.536$), there were no significant differences between groups.

The AVPR_{1a} gene expression in different areas of the CNS in female mice shows that OTKO females increased significantly the gene expression of this receptor in the HPT ($P=0.017$), and decreased in the HPC ($P=0.008$) when compared to WT group. However, no significant differences were found in the PFC ($P=0.150$) and OB ($P=0.390$) areas between the WT and OTKO groups (Figure 2).

The Figure 3 showed that OTKO females decreased significantly the gene expression of ER α in the PFC ($P=0.026$) when compared to WT. However, no significant differences were found between the groups studied in the HPT ($P=0.600$), OB ($P=0.730$) and HPC ($P=0.359$). OTKO females significantly decreased ER β gene expression only in the PFC ($P=0.020$) when compared to control mice. However, there were no significant differences between the groups studied in the OB ($P=0.662$), HPT ($P=0.612$) and HPC ($P=0.896$) (Figure 6) mice.

The Figure 4 showed no significant differences in gene expression DOPAR_{D2} in any of the studied structures when comparing the two group [OB ($P=0.328$), HPT ($P=0.778$), PFC ($P=0.179$) and HPC ($P=0.516$)].

Finally, there was no significant difference in the mRNA synthesis of AVP in the HPT of OTKO female when comparing with WT ($P=0.748$) (Figure 5).

4 DISCUSSION

Studies identifying genes involved in the sexual behavior of females are of crucial importance, as these results suggest molecular pathways that modulate the brain circuitry of reproductive behavior.

Recently, it was shown that the sexual behavior of male mice was not affected by the absence of OT [48]. On the other hand, our results confirm the findings that showed the OT gene knockout significantly decreased sexual behavior of female mice [49]. Our results also showed a significant increase in the frequency and duration of non-receptive postures in OTKO group compared to the WT group.

The OT seems to be necessary to establish the female preference for her partners [50]. In rats, during their first sexual experience, peripheral administration of OT increased affiliative behavior [51]. The affiliative behaviors have been described as a way to maintain and establish social relationship. This behavior may be related to cutting repertoire, in a roundabout way, acting as a tension reducer and also as a sign of interest by partner [52]. According to Becker [49], the OT is significantly involved in the sexual behavior of females, a key modulator of lordosis behavior. Thus, our results corroborate these findings because the OT gene knockout reduces the sexual behavior of females and increased non-receptive postures compared to WT group.

Another aspect to be highlighted in our results is the impact of OT deficit in gene expression of different receptors in the CNS. Regarding the gene expression of OTR receptors, was observed only a decrease in the HPC of OTKO than WT females. In rodents, it is known that HPC is essential to recognize other animals of the same species [15]. According to the study by Ferguson et al. [53], OTKO mice failed to develop social memory when compared with WT mice. Administration of OT for OTKO group reversed the social memory deficits, and treatment with an OT antagonist produced an effect similar to social amnesia in WT group. Our studies support the hypothesis that the proper expression of OTR in HPC is critical to partner recognition, as well as for the normal development of social memory and reproductive behavior.

Another peptide that participates in the modulation of social behavior is the AVP, and our results showed lower levels of expression of receptors AVPR_{1a} in

the HPT, but increased expression in HPC of OTKO females when compared to WT. In female rodents, electrical stimulation of the hypothalamic preoptic area interrupts the lordosis reflex, main receptive component, but without interfering in proceptivity component [12;13]. Pharmacological studies indicate that AVP administration may improve social memory [53] and that the pair formation can be significantly changed by a small change in the expression of AVPR receptors in the CNS [50].

In addition, a previous study [15] described high level of gene expression of AVPR in the hippocampal region and the importance of AVP in sexual motivation. Furthermore, AVP plays a role in modulating the arousal and HPC through AVPR_{1a} and AVPR_{1b} receptor [54] and signaling for pair formation is mediated by AVPR_{1a} [55].

In juvenile male rodents, experiments promoting AVPR_{1a} decrease in density in the ventral striatal-pallidal area lead to significant losses in preference for a partner [55]. Our results can infer that the difficulty in recognizing the partner, lack of motivation and decreased sexual behavior in OTKO female may also be associated with decreased gene expression of AVPR_{1a} in HPT and HPC.

Regarding the PFC, our findings are novel because they present the OT modulating gene expression of ER α and ER β receptors in the PFC of females and combining this expression with sexual behavior, since the literature describes only influence of the peripheral fluctuation of gonadal hormones and increased expression of OT and its receptors in the CNS [28;29]. Sexual behavior is driven by a sophisticated interaction between the steroid hormone actions in the brain leading to the state of sexual reward [56]. Analysis of neuroimaging in animal models and humans suggest that recruitment of motor neural network is integrated part of sexual behavior [14]. The PFC is extremely plastic and prefrontal regions often respond very differently to the same experience, because the plasticity in the PFC appears to be different when compared to other cortical regions [57]. Several behavioral studies in humans and animals suggest that replacement with EST perfects tasks that are dependent on PFC [58;59;60]. Behavioral studies in primates show that the EST can alter the synaptic organization and improve performance in cognitive tasks PFC [61]. Davis et al. [62] conclude that animals with lesions of the medial PFC have the ability to suppress seeking sexual reward in the face of aversive consequences. In our experiments, the OTKO model

significantly decreased gene expression of ER α and ER β in the PFC when compared to WT females.

On the other hand, no significant differences in gene expression DOPAR_{D2} in BO, HPT, PFC or HPC OTKO females were found when compared with the WT group. The results of Triana-Del Rio et al. [63] showed that OT administration with a D₂ agonist (quinpirole) in male rats promoted sexual preferences by a male partner, while mice not treated with OT and/or D₂ agonist, showed sexual preferences for the females. Triana-Del Rio et al. [63] also analyzed the size of areas of sexual dimorphism, the preoptic area and the SON, reaching the conclusion that the preference for the same gender individuals does not correlate with morphological changes in these structures. Sanna et al. [64] studied the different patterns of sexual behavior of rats of the roman lines and correlated differences in activity in the mesolimbic dopamine system with copulatory motivation and sexual performance. In samples obtained from nucleus accumbens increase in concentration of DOPA and its major metabolite, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid was significantly different across these mice sexual performance. Using biochemical and behavioral analysis these studies directs to the vision that different sexual patterns of strains roman rats are at least partly due to the more robust functionality of the mesolimbic dopaminergic system [64]. These findings underline the importance of the dopaminergic system in sexual behavior. In contrast, our work has suggested that although DOPA modify sexual behavior, no changes in expression DOPAR_{D2} were found.

An interesting aspect of our study that should be highlighted is the fact that OT gene knockout does not promote any difference in AVP synthesis in the HPT in OTKO females compared to WT group, although two studies had already shown that transcription levels of AVP are reduced in the PVN and SON of OTKO mice [22;23]. In the study by Becker et al. [49], baseline plasma levels of AVP in OTKO and WT females were measured, although there was no significant difference. Our results agree with the findings of Becker et al. [49], since the central AVP concentration was not affected OTKO in females when compared to WT.

5 CONCLUSIONS

To study the social behavior, different approaches are used, including gene

expression assays. Thus, study [65] has used RT-PCR, by relative quantification of mRNA for analyzing gene expression in the CNS. However, an inherent limitation of our study is that we evaluated the mRNA expression of receptors, not the translated protein. Our key findings allow us to infer that the decrease in lordosis behavior and the increase in non-receptive attitudes were influenced by central and peripheral absence of OT. In addition, we may associate the absence of circulating OT with the observed changes in gene expression of OTR (HPC), AVPR_{1a} (HTP and HPC), ER α (PFC) and ER β (PFC). Thus, we conclude that the absence of circulating OT and the significant variation in the expression of genes studied (OTR, AVPR_{1a}, ER α and ER β) in the CNS together may explain the profound decrease in sexual behavior observed in OTKO females.

REFERENCES

- [1] Classen W. Behaviour, Neurology and Electrophysiology. In: KRINKE GJ. (Ed.). *The Laboratory Rat (The Handbook of Experimental Animals)*. Academic Press 2000;419-435.
- [2] Giovenardi M, Padoin MJ, Cadore LP, Lucion AB. Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. *Physiology Behavior* 1998;63:351-359.
- [3] Cunningham ET, Sawchenko PE. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *Trends in Neuroscience* 1991;14:406-411.
- [4] Badoer E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2001;28:95-99.
- [5] Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological Review* 2001;81:629-683.
- [6] Mantella RC, Vollmer RR, Li X, Amico JA. Female oxytocin-deficient mice display enhanced anxiety-related behavior. *Endocrinology* 2003;144:2291-2296.
- [7] Young III WS, Gainer H. Transgenesis and the study of expression, cellular targeting and function of oxytocin, vasopressin and their receptors. *Neuroendocrinology* 2003;78:185-203.
- [8] Hara Y, Battey J, Gainer H. Structure of mouse vasopressin and oxytocin genes. *Molecular Brain Research* 1990;8:319-324.
- [9] Sausville E, Carney D, Battey J. The human vasopressin gene is linked to the oxytocin gene and is selectively expressed in a cultured lung cancer cell line. *Journal of Biological Chemistry* 1985;260:10236–10241.
- [10] Mohr E, Schmitz E, Richter D. A single rat genomic DNA fragment encodes both the oxytocin and vasopressin genes separated by 11 kilobases and oriented in opposite transcriptional directions. *Biochimie* 1988;70:649-54.
- [11] de Olmos J, Beltramino CA, Alheid GF. Amygdala and extended amygdala of the rat: cytoarchitectonical, fibroarchitectonical and chemoarchitectonical survey. *The Rat Nervous System*. Elsevier Academic Press 2004;1:509–603.
- [12] Christensen A, Dewingand P, Micevych P. Immediate early gene activity-regulated cytoskeletal-associated protein regulates estradiol-induced lordosis behavior in female rats. *Journal of Neuroscience Research* 2015;93(1):67–74. doi: 10.1002/jnr.23463.
- [13] Sakuma Y. Estradiol-sensitive projection neurons in the female rat preoptic area. *Frontiers in Neuroscience* 2015;9:67. doi: 10.3389/fnins.2015.00067
- [14] Schecklmann M, Engelhardt K, Konzok J, Rupprecht R, Greenlee

MW, Mokros A, Langguth B, Poepl TB. Sexual motivation is reflected by stimulus-dependent motor cortex excitability. *Social Cognitive Affective Neuroscience*, 2015.

[15] Hitti FL, Siegelbaum SA. The Hippocampal CA2 Region is Essential for Social Memory *Nature* 2014;508:88-92. doi:10.1038/nature13028

[16] Dominguez J, Riolo JV, Xu Z, Hull EM. Regulation by the Medial Amygdala of Copulation and Medial Preoptic Dopamine Release. *The Journal of Neuroscience* 2001;21(1): 349-355.

[17] Pfaff DW, Schwartz-Giblin S. Cellular mechanisms of female reproductive behaviors. En: *The Physiology of Reproduction*. Raven Press 1988;1487-1568.

[18] Miller EK, Cohen JD. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annual Review of Neuroscience* 2001;24:167–202.

[19] Antunes IB, Da Silva A, Kawakami R, Andersen ML. The female rat. In: Andersen ML, Tufik S, editors. *Animal Models as Tools in Ethical Biomedical Research* 2010;103–120.

[20] Debiec J. From affiliative behaviors to romantic feelings: A role of nanopeptides. *FEBS Letters* 2007;581:2580-2586.

[21] Carmichael MS, Humber R, Dixen J, Palmisano G, Greenleaf W, Davidson JM. Plasma oxytocin increases in the human sexual response. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1987;64:27.

[22] Young III WS, Shepard E, Amico J, Hennighausen L, Wagner KU, Lamarca MU, McKinney C, Ginns E. Deficiency in mouse oxytocin prevents milk ejection, but not fertility or parturition. *Journal of Neuroendocrinology* 1996;8:847-853.

[23] Ozaki Y, Nomura M, Saito J, Luedke CE, Muglia LJ, Matsumoto T, Ogawa S, Ueta Y, Pfaff DW. Expression of the arginine vasopressin gene in response to salt loading in oxytocin gene knockout mice. *Journal of Neuroendocrinology* 2004;16:39–44.

[24] de Vries GJ. Sex differences in vasopressin and oxytocin innervation of the brain. *Progress in Brain Research* 2008;170:17-27.

[25] Pedersen CA, Boccia ML. Vasopressin interactions with oxytocin in the control of female sexual behavior. *Neuroscience* 2006;139(3):843-851.

[26] Caldwell HK, Lee HJ, Macbeth AH, Young III WS. Vasopressin: behavioral roles of an “original” neuropeptide. *Progress in Neurobiology* 2008;84:1-24. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.10.007.

[27] Kim S-J, Young LJ, Gonen D, Veenstra-VanderWeele J, Courchesne R, Courchesne E, Lord C, Leventhal BL, Cook EH Jr, Insel TR. Transmission disequilibrium testing of arginine vasopressin receptor 1A (AVPR1A)

polymorphisms in autism. *Molecular Psychiatry* 2002;7:503–507. doi: 10.1038/sj.mp.4001125

[28] Somponpun S, Sladek C. Osmotic regulation estrogen receptor- β rat in vasopressin and oxytocin Neurons. *The Journal of Neuroscience* 2003;23:4261-4269.

[29] Suzuki S, Handa RJ. Estrogen receptor-beta, but not estrogen receptor-alpha, is expressed in the prolaction neurons of the female rat paraventricular and supraoptic nuclei: comparison with other neuropeptides. *The Journal of Comparative Neurology* 2005;484:28-42.

[30] Mitchell BF, Fang X, Wong S. Metabolism of oxytocin in rat uterus and placenta in late gestation. *Biology of Reproduction* 1997;57:807-812.

[31] Voisin DL, Simonian SX, Herbison AE. Identification of estrogen receptor-containing neurons projecting to the rat supraoptic nucleus. *Neuroscience* 1997;78:215-28.

[32] Becker JB n.d. Chapter 3: Hormonal influences on female sex behavior. University of Michigan, Psychology 22, 2008.

[33] Becker JB. Gender Differences in Dopaminergic Function in Striatum and Nucleus Accumbens. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1999;64(4):803–812.

[34] Rasia-Filho AA, Lucion AB. Effects of 8-OH-DPAT on sexual behavior of male rats castrated at different ages. *Hormones and Behavior* 1996;30:251-8.

[35] Swaney WT, Dubose BN, Curley JP, Champagne FA. Sexual experience affects reproductive behavior and preoptic androgen receptors in male mice. *Hormones and Behavior* 2012;61:472–478. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.01.001.

[36] Jonhansen JA, Clemens LG, Nunez AA. Characterization of copulatory behavior in female mice: evidence for paced mating. *Physiology & Behavior* 2008;95:425-429. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.07.004

[37] Hardy DF, DeBold JF. Effects of mounts without intromission upon the behavior of female rats during the onset of estrogen-induced heat. *Physiology & Behavior* 1971;7:643-645.

[38] Chiu K, Lau WM, Lau HT, So KF, Chang RCC. Micro-dissection of Rat Brain for RNA or Protein Extraction from Specific Brain Region. *Journal of Visualized Experiments* 2001;7,269.

[39] Palkovits M. Maps and guide to micro-dissection of the rat brain. New York: Elsevier,1988.

[40] Swanson LW. Brain maps: structure of the rat brain. 3rd revised edition. Elsevier Academic Press, 2004.

- [41] Langnaese K, John R, Schweizer H, Ebmeyer U, Keilhoff G. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Molecular Biology* 2008;9:1-15. doi:10.1186/1471-2199-9-53
- [42] Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 2000;132:365-386.
- [43] Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J. GenBank. *Nucleic Acids Research* 2013;41,36-42.
- [44] Clipperton-Allen AE, Lee AW, Reyes A, Devidze N, Phan A, Pfaff DW et al. Oxytocin, vasopressin and estrogen receptor gene expression in relation to social recognition in female mice. *Physiology & Behavior* 2012;105(4):915–924. doi:10.1016/j.physbeh.2011.10.025
- [45] Cook NI, Kleinig TJ, Van-Den-Heuvel C, Vink R. Reference genes for normalising gene expression data in collagenase-induced rat intracerebral haemorrhage. *BMC Molecular Biology* 2010;11(7):1-11.doi:10.1186/1471-2199-11-7. doi:10.1186/1471-2199-11-7
- [46] Nelissen K, Smeets K, Mulder M, Hendriks JJ, Ameloot M. Selection of reference genes for gene expression studies in rat oligodendrocytes using quantitative real time PCR. *Journal of Neuroscience Methods* 2010;187(1):78-83.doi: 10.1016/j.jneumeth.2009.12.018.
- [47] de Moura AC, Lazzari VM, Agnes G, Almeida S, Giovenardi M, da Veiga ABG. Estudo de expressão transcricional no sistema nervoso central de ratos: qual gene deve ser usado como controle interno? *Einstein* 2014;12(3):336-41.<http://dx.doi.org/10.1590/S1679-45082014AO3042>
- [48] Lazzari VM, Becker RO, Azevedo MS, Morris M, Rigatto K, Almeida S, et al. Oxytocin modulates social interaction but is not essential for sexual behavior in male mice. *Behavioural Brain Research* 2013;244:130–6.doi: 10.1016/j.bbr.2013.01.025
- [49] Becker RO, Lazzari VM, Menezes IC, Morris M, Rigatto K, Lucion AB, Rasia-Filho AA, Giovenardi M. Sexual behavior and dendritic spine density of posterodorsalmedial amygdala neurons in oxytocin knockout female mice. *Behavioural Brain Research* 2013;256(1):95–100. doi:10.1016/j.bbr.2013.07.034
- [50] Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neurociências - desvendando o sistema nervoso. *Artmed* 3^oed., 2008.
- [51] Holley A, Bellevue S, Vosberg D, Wenzeln K, Roorda S, Pfaus JG. The role of oxytocin and vasopressin in conditioned mate guarding behavior in the female rat. *Physiology & Behavior* 2015;144(15):7–14.doi: 10.1016/j.physbeh.2015.02.039
- [52] Barbosa MM, Ferreira, JM, Santos JSC, Ferreira NS, Albuquerque ACSR. Comportamento afiliativo de proximidade em animais reprodutores de saguis,

Callithrix jacchus, em um grupo com sistema de acasalamento poliândrico, durante a gestação e pós-parto da fêmea dominante. 62ª Reunião Anual da SBPC, 2010.

[53] Ferguson JN, Young LJ, Insel TR. The neuroendocrine basis of social recognition. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2002;23(2):200–224. doi: 10.1006/frne.2002.0229

[54] Zhang L, Hernández VS. Synaptic innervation to rat hippocampus by vasopressin-immuno-positive fibres from the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. *Neuroscience* 2013; 228(3):139–162. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.010

[55] Barrett CE, Keebaugh AC, Aherna TH, Bassd CE, Terwilligerd EF, Younga LJ. Variation in vasopressin receptor (Avpr1a) expression creates diversity in behaviors related to monogamy in prairie voles. *Hormones and Behavior* 2013;63(3):518–526. doi: 10.1016/j.yhbeh.2013.01.005.

[56] Pfaus JG, Kippin TE, Centeno S. Conditioning and sexual behavior: a review. *Hormones and Behavior* 2001; 2:291–321.

[57] Kolb B, Gibb R. Plasticity in the prefrontal cortex of adult rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2015;9(15):1-11.doi:10.3389/fncel.2015.00015

[58] Keenan PA, Ezzat WH, Ginsburg K, Moore GJ. Prefrontal cortex as the site of estrogen's effect on cognition. *Psychoneuroendocrinology* 2001;26:577–590.

[59] Solis-Ortiz MS, Marquez-Rangel R. Effects of estrogen replacement therapy on a decision-making task and depressive symptoms in postmenopausal women. *Society Neuroscience Abstracts* 2001;27:311-10.

[60] Rapp PR, Morrison JH, Roberts JA. Cyclic estrogen replacement improves cognitive function in aged ovariectomized rhesus monkeys. *Journal of Neuroscience* 2003;23:5708–5714.

[61] Tang Y, Janssen WGM, Hao J, Roberts JA, McKay H, Lasley B, Allen PB, Greengard P, Rapp PR, Kordower JH, Hof PR, Morrison JH. Estrogen Replacement Increases Spinophilin-immunoreactive Spine Number in the Prefrontal Cortex of Female Rhesus Monkeys. *Cereb Cortex* 2004;14(2):215-223. doi:10.1093/cercor/bhg121

[62] Davis JF, Loos M, Di Sebastiano AR, Brown JL, Lehman MN, Coolen LM. Lesions of the Medial Prefrontal Cortex Abolish Conditioned Aversion Associated with Sexual Behavior in Male Rats. *Biological Psychiatry* 2010;15(67)12:1199–1204. doi:10.1016/j.biopsych.2009.12.029

[63] Triana-Del Rio AR, Tecamachaltzi-Silvarána MB, Díaz-Estradaa VX, Herrera-Covarrubiasa D, Corona-Moralesb AA, Pfausc JG, Coria-Avilaa GA. Conditioned same-sex partner preference in male rats is facilitated by oxytocin and dopamine: Effect on sexually dimorphic brain nuclei. *Behavioural Brain Research*

2015;283(15):69–77.doi:10.1016/j.bbr.2015.01.019.

[64] Sanna F, Piludua MA, Cordaa MG, Melisb MR, Giorgia O, Argiolas A. Involvement of dopamine in the differences in sexual behaviour between Roman high and low avoidance rats: An intracerebralmicrodialysis study. *Behavioural Brain Research* 2015;281(15):177–186. doi:10.1016/j.bbr.2014.12.009

[65] Driessen TM, Eisinger BE, Zhao C, Stevenson SA, Saul MC, Gammie SC. Genes showing altered expression in the medial preoptic area in the highly social maternal phenotype are related to autism and other disorders with social deficits. *BMC Neuroscience* 2014;15:11.doi:10.1186/1471-2202-15-11

Highlights

OTKO females decrease the lordosis and increase the non-receptive postures;

OTKO group decreases the gene expression of AVPR_{1a} in the HTP and increased in the HCP;

OT gene-knockout females decrease the gene expression of ER α /ER β in the PFC;

The gene expression of OTR decreased in the HPC of OTKO females;

Oxytocin gene-knockout does not promote differences in AVP mRNA synthesis in HPT;

Table 1: Sequences of primers receptors studied and reference gene (housekeeping genes).

RECEPTOR	SEQUENCE OF PRIMERS	
OXYTOCIN	LEFT	5' - CGA TTG CTG GGC GGT CTT CA- 3'
	RIGHT	5' - CCG CCG CTG CCG TCT TGA G- 3'
VASOPRESSIN_{V1a}	LEFT	5' – TGG TCC GTG ATT GAA AAC CCA- 3'
	RIGHT	5' – CCT TCT GTC TGT TGG TGA GCA- 3'
ESTROGEN α	LEFT	5' - CAA GAA CGT TGT GCC CCT CT- 3'
	RIGHT	5' - TGT AAG GAA TGT GCT GAA GTG GA- 3'
ESTROGEN β	LEFT	5' - GGG ACA TGT ACC CTA GCA TCG- 3'
	RIGHT	5' - TGG AAA GTA CAA CGA GAG CCT- 3'
DOPAMINE _{D2}	LEFT	5' - CTC AGG AGC TGG AAA TGG AG- 3'
	RIGHT	5' - CAT GCC CAT TCT TTT CTG GT- 3'
β-ACTIN	LEFT	5' - TAT GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG- 3'
	RIGHT	5' - TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC AT- 3'
CICLOFILIN A	LEFT	5' - TAT CTG CAC TGG CAA GAC TGA GTG- 3'
	RIGHT	5' - CTT CTT GCT GGT CTT GCC ATT CC- 3'

Table 2: Sexual behavior in WT and OTKO female mice.

Parameters behavioral	WT (11)	OTKO (11)	<i>P</i>
Frequency of mounts	23.3 ± 3.0	14.5 ± 4.3	0.07
Latency lordosis (s)	49.8 ± 113.8	841.9 ± 53.9	0.01 *
Frequency of lordosis	6.2 ± 2.3	0.5 ± 0.4	0.02 *
Duration of lordosis (s)	49.2 ± 19.9	7.1 ± 7.0	0.02 *
Lordosis quotient	30.0 ± 11.6	2.8 ± 2.6	0.02 *
Latency non-receptive postures (s)	73.69 ± 11.36	25.77 ± 8.72	0.01 *
Frequency non-receptive postures	9.53 ± 3.66	35.62 ± 12.14	0.01 *
Duration non-receptive postures (s)	39.69 ± 13.57	134.90 ± 40.43	0.01 *

Data were expressed as mean [\pm SEM]. Mann-Whitney test (U test of Mann-Whitney). * Different from WT group.

OXYTOCIN RECEPTOR

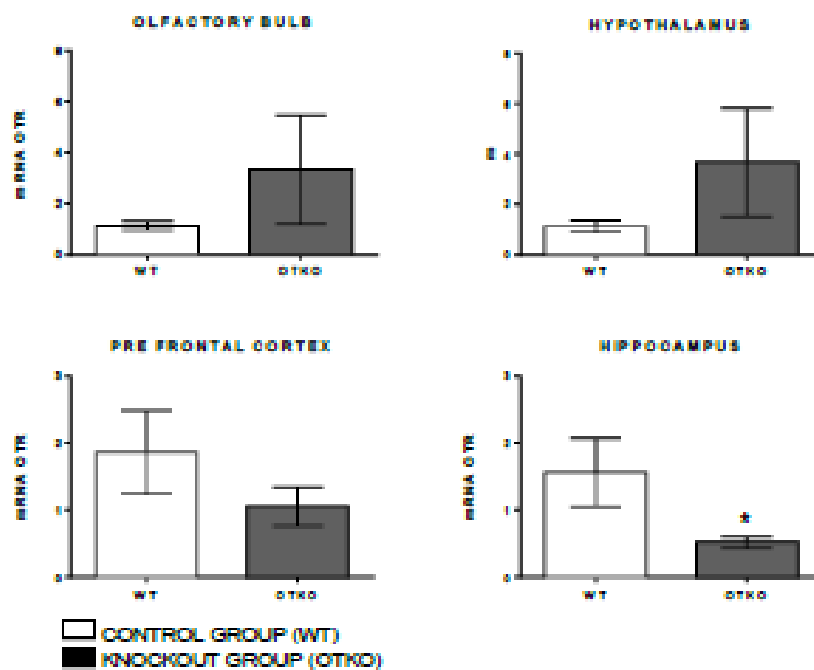


Figure 1. Quantification relative of gene expression of oxytocin receptor in the central nervous system of control females (WT) and knockout for the OT gene (OTKO). Data were expressed as mean \pm SEM. Mann-Whitney test (U test of Mann-Whitney). * Difference compared to WT group.

VASOPRESSIN RECEPTOR

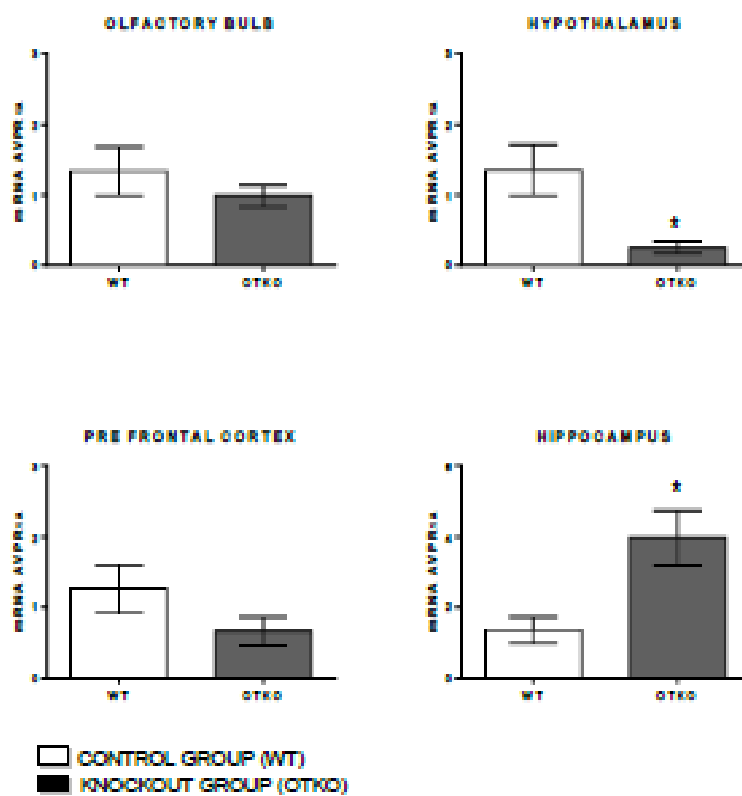


Figure 2. Quantification relative of gene expression of vasopressin receptor in the central nervous system of control females (WT) and knockout for the OT gene (OTKO). Data were expressed as mean \pm SEM. Mann-Whitney test (U test of Mann-Whitney). * Difference compared to WT group.

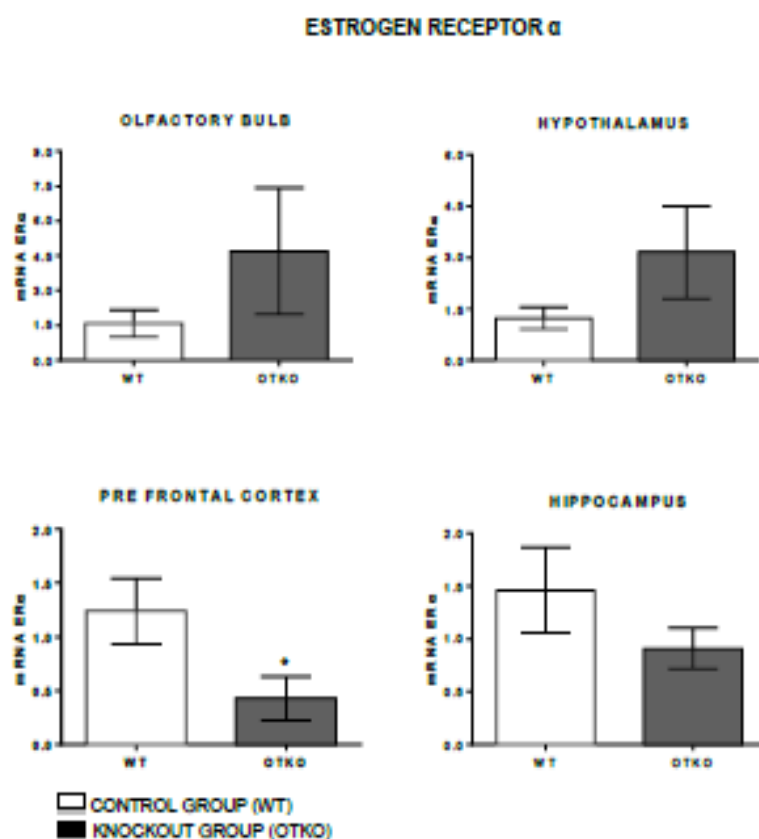


Figure 3. Quantitation relative of estrogen receptor α gene expression in the central nervous system control mice (WT) and knockout OT gene (OTKO). Data were expressed as mean \pm SEM]. Mann-Whitney test (U test of Mann-Whitney). * Difference compared to the WT group.

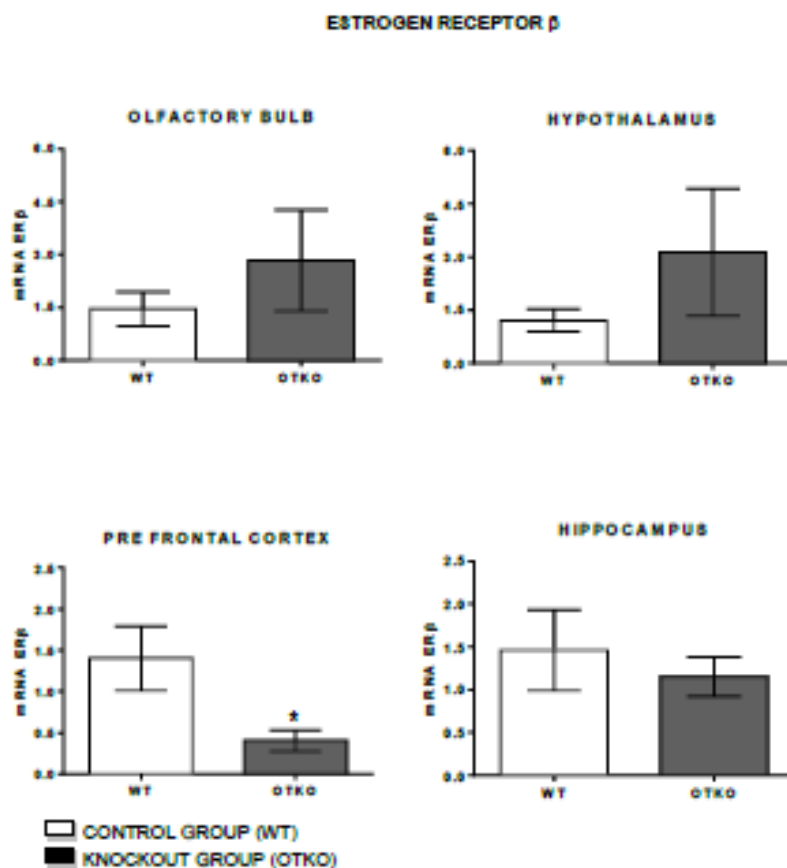


Figure 4. Quantification relative of gene expression of estrogen receptor β in the central nervous system of control females (WT) and knockout for the OT gene (OTKO). Data were expressed as mean \pm SEM. Mann-Whitney test (U test of Mann-Whitney). * Difference compared to WT group.

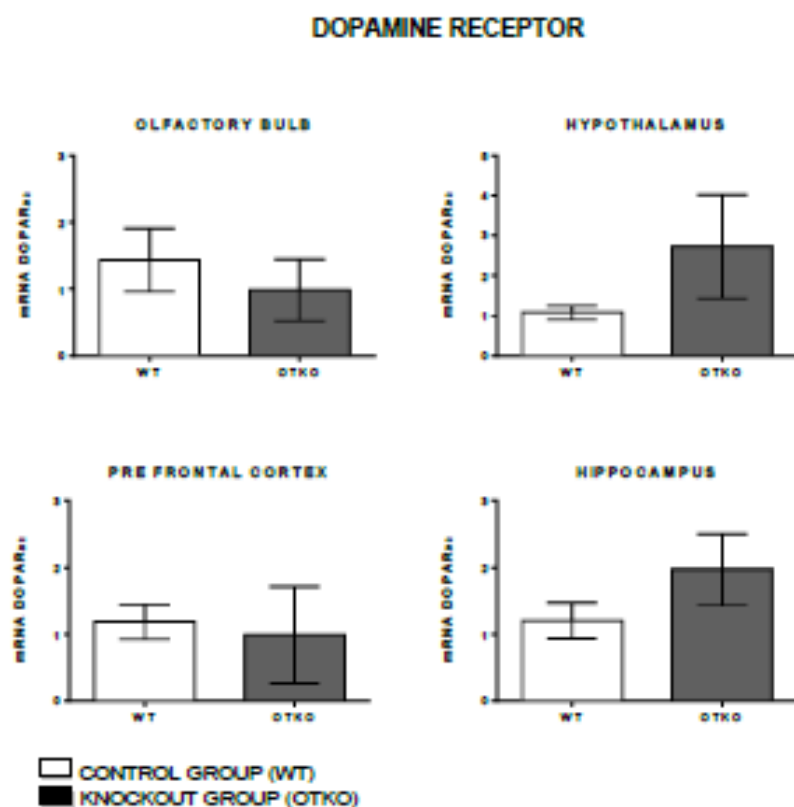


Figure 5. Quantification relative of gene expression of dopamine receptor in the central nervous system of control females (WT) and knockout for the OT gene (OTKO). Data were expressed as mean \pm SEM. Mann-Whitney test (U test of Mann-Whitney). * Difference compared to WT group.

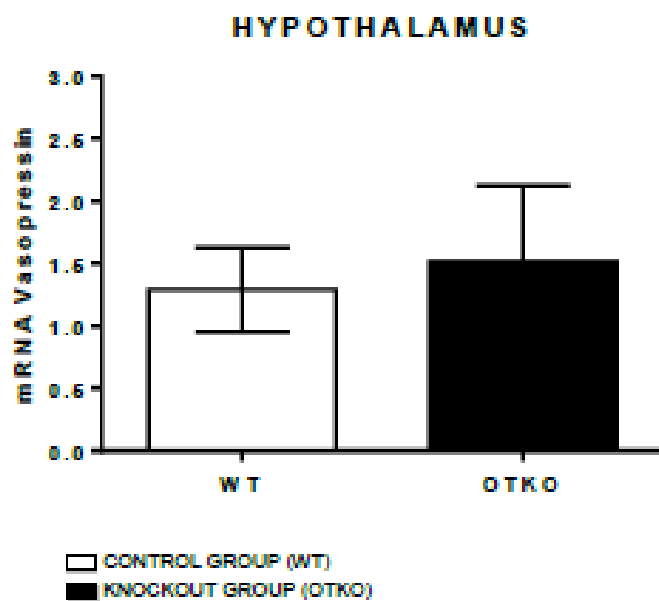


Figure 7. Quantification relative of vasopressin mRNA synthesis in control females hypothalamus (WT) and knockout for the OT gene (OTKO). Data were expressed as mean \pm SEM]. Mann-Whitney test (U test of Mann-Whitney). * Difference compared to WT group.

9.3 ANEXO III – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA FRONTIERS IN PSYCHIATRY

Josi Maria Zimmermann-Peruzatto, Virgínia M Lazzari, Ana Carolina Moura, Silvana Almeida and Marcia Giovenardi

Journal Name: Frontiers in Psychiatry

ISSN: 1664-0640

Article type: Review Article

First received on: 21 Mar 2015

Frontiers website link: www.frontiersin.org



The vasopressinergic system: structure and function in social behavior

Josi Maria Zimmermann-Peruzatto, Virgínia M Lazzari, Ana carolina Moura, Silvana Almeida and Marcia Giovenardi

Journal Name:	Frontiers in Psychiatry
ISSN:	1664-0640
Article type:	Review Article
First received on:	21 Mar 2015
Frontiers website link:	www.frontiersin.org

The vasopressinergic system: structure and function in the social behavior

Josi Maria Zimmermann-Peruzatto¹, Virgínia Meneghini Lazzari², Ana Carolina Moura², Silvana de Almeida^{2,3}, Márcia Giovenardi^{1,3*}

¹Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil

³Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil

*Correspondence: Dra. Márcia Giovenardi
Rua Sarmiento Leite, 245/308
90050-170 - Porto Alegre, RS, Brasil
Tel. +55-51-3303-8751
e-mail: giovenardi.marcia@gmail.com

Abstract

Vasopressin (VP) and VP-like neuropeptides are evolutionarily stable peptides that are found in all vertebrate species. In non-mammalian vertebrates, vasotocin (VT) plays a role similar to mammalian VP, whereas mesotocin and isotocin are functionally similar to mammalian oxytocin (OT). Here, we review the involvement of VP in brain circuits, synaptic plasticity, evolution, and function, highlighting the role of VP in social behavior. In all studied species, VP is encoded on chromosome 20p, and in mammals, VP is produced in specific hypothalamic nuclei and released by the posterior pituitary. The role of VP is mediated by the stimulation of receptors V_1 , V_2 , and V_3 as well as oxytocinergic and purinergic receptors. The functions of VT and VP are usually related to osmotic and cardiovascular homeostasis when acting peripherally. However, these neuropeptides are also critically involved in the central modulation of social behaviors such as sexual behavior, aggressive behavior, pair-bonding, parental care, pairing recognition and social memory. Evidences suggest that these effects are mediated mainly by receptor V_{1a} in specific brain circuits this receptors provide important information for the onset and control of social behaviors in normal and pathological conditions.

Keywords: evolutionary lineage VP, vasopressin-like, receptors VP, receptor V_{1a} , social behavior.

1. General aspects

The vasopressin-like (VP-like) and oxytocin-like (OT-like) peptides have been isolated from four invertebrate phyla and from the seven major vertebrate families, representing more than one hundred and twenty species (1). Thus, the ancestral gene encoding the precursor protein appears to predate the divergence of the vertebrate and invertebrate families, approximately 700 million years ago (2). Generally, all vertebrate species possess a VP-like and an OT-like peptide; hence, two evolutionary lineages can be traced.

The lineage for VP-like peptides is evolutionarily stable. In non-mammalian vertebrates, vasotocin (VT) shares similar roles with mammalian arginine vasopressin (VP), whereas mesotocin and teleost isotocin (IT) are functionally similar to mammalian oxytocin (OT). The neuronal expression and gene regulation of these peptide hormones appear to be conserved among vertebrates (3). Receptors for VP-like and OT-like peptides can also be traced back to invertebrates (4), and distinct VP-like and OT-like receptors have been found in fishes and tetrapods (5).

VP and OT differ in only two of nine amino acid residues, both of which are structurally related and in the same superfamily (6). This VP–OT superfamily is an ancient group of peptides that can be traced back to diverse types of invertebrates such as annelids and mollusks (4). There is a homology of 80% between VP and OT, but these neuropeptides have distinct physiological activities.

Both VP and OT are produced in the hypothalamus, released in the posterior pituitary, and distributed throughout the brain (7). The vasopressor effect of pituitary extract, first observed in 1895, was attributed to the posterior lobe of this gland (8). However, it was only 18 years later that the antidiuretic effect of neurohypophyseal extract was demonstrated (9). The isolation of VP in the fifties proved that the same hormone is synthesized in the posterior pituitary and possesses both antidiuretic and vasopressor effects (10).

We review the involvement of VP in brain circuits, synaptic plasticity, evolution, and function, highlighting the role of VP in social behavior.

2. Vasopressin and vasopressin-like peptides

2.1. Gene structure

Nucleotide sequences encoding the VP and OT hormones are highly

homologous. In all species, VP and OT are encoded by separate genes, but they lie on the same chromosome at 20p, separated by a segment of DNA only 12 kilobases long (11). The similarity in the intron-exon structures of the two genes and their close apposition are suggestive of recent gene duplication (12).

2.2. Synthesis and release

VP is a nonapeptide with a disulfide bridge between two cysteine amino acids and is synthesized in a smaller amount by the parvocellular neurons, and mainly by the magnocellular neurons of the hypothalamus in paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei (13). These nuclei send axons to the posterior pituitary along the supraoptic-hypophyseal tract. In a prohormone state, VP migrates along the supraoptic–hypophyseal tract to the posterior pituitary, where it is released into the circulation (14).

The PVN and SON nuclei receive afferent nerve impulses from receptors in the left atrium, aortic arch and carotid sinuses via the vagus nerve. PVN and SON receive osmotic input from the lamina terminalis, which is excluded from the blood–brain barrier and is thus affected by systemic osmolality. Furthermore, Holmes *et al.* (14) suggested that in the rat brain extrahypothalamic structures such as the bed nucleus of the stria terminalis, the medial amygdala, nucleus of the locus coeruleus, hippocampus, choroid plexus, in addition to the hypothalamus, are able to synthesize VP.

VP is also released at the anterior pituitary, where it acts on the V_{1b} receptor ($V_{1b}R$) helping to control adrenocorticotrophic hormone (ACTH) release and therefore modulating the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (15).

2.3 Vasopressin receptors (VPRs)

The role of VP is mediated by stimulation of tissue-specific G-protein-coupled receptors (GPCRs), which are classified into V_1 vascular (V_1R), V_2 renal (V_2R), V_3 pituitary (V_3R) and oxytocinergic (OTR) and P_2 purinergic (P_2R) receptors (16).

The GPCRs comprise seven hydrophobic transmembrane α -helices joined by alternating intracellular and extracellular loops, an extracellular amino-terminal domain, and a cytoplasmic carboxyl-terminal domain (17). The actions of VP are signaled through pathways that are similar to extracellular agents such as

hormones, neurotransmitters and chemokines. Local mediators signal to the four main G protein families to regulate metabolic enzymes, ion channels, and transcriptional regulators. The extracellular signals are routed to specific G proteins through distinct types of receptors. Several important hormones interact with the G_i pathway, which is characterized by the inhibition of adenylyl cyclase (18).

Agonist stimulation of VPR leads to receptor subtype-specific interactions with G-protein-coupled receptor kinases (GRKs) and protein kinase C (PKC) through specific motifs that are present in the carboxyl termini of the receptors (19). Guanine nucleotide-binding proteins (G-proteins) are signal transducers that are attached to the cell surface membrane and connect receptors to effectors and thus to intracellular signaling pathways (20). The signal of the VP is transmitted through G_s and $G_{q/11}$ subtypes (18).

2.3.1 V_1 receptor

The V_1 Rs are mainly found on vascular smooth muscle and cause vasoconstriction by an increase in intracellular calcium via the phosphatidylinositol-bisphosphate cascade. The platelets express the V_1 R, which upon stimulation induces an increase in intracellular calcium (21). Studies in rats show that the V_1 Rs are also located in the cardiac myocytes, brain, testis, superior cervical ganglion, liver, blood vessels, kidney, vasa recta and renal medulla (22), but the physiologic roles of VP remain unknown in many of these diverse tissues. There is interspecies variation in the V_1 R; although rat VP and human VP are identical, the human V_1 R is only 80% homologous with the rat V_1 R (1).

2.3.2 V_2 receptor

The most important antidiuretic effect of VP occurs via activation of the V_2 R. VP regulates water excretion from the kidney by increasing the osmotic water permeability of the renal collecting duct, an effect that is explained by V_2 R coupling with the G_s signaling pathway, which activates cAMP (23). The increased intracellular cAMP in the kidney in turn triggers fusion of aquaporin-2-bearing vesicles with the apical plasma membrane of the collecting duct principal cells, increasing water reabsorption (24). VP adjusts water homeostasis regulation of the fast shuttling of aquaporin 2 to the cell surface and stimulates the synthesis of

mRNA encoding this protein (25).

Moreover, V_2R is also expressed in the endothelium because the potent V_2R agonist *1-deamino-8-D-arginine vasopressin* causes the release of the von Willebrand factor and vasodilation (26). Phillips *et al.* (1990) (22) evaluated V_1R and V_2R binding sites *in vitro* using selective radioligands, and their results demonstrated no binding to the endothelium or liver, where *1-deamino-8-D-arginine vasopressin* might influence clotting factor release, or in the brain, spinal cord, sympathetic ganglia, heart or vascular smooth muscle, regions where *1-deamino-8-D-arginine vasopressin* might cause vasodilation. For this study, the specific binding was only identified in the kidney, which is consistent with the known distribution of antidiuretic V_2Rs on renal collecting tubules (22).

2.3.3 V_3 receptor

The V_3R has a pharmacological profile that distinguishes it from the human V_1R and activates several signaling pathways via different G-proteins, depending on the level of receptor expression (27).

Thibonnier *et al.* (1997) (27) showed that one G-protein appears to participate in signal transduction pathways linked to V_3Rs , depending on the level of receptor expression and the concentration of VP (27). For instance, VP causes secretion of ACTH from the anterior pituitary cells in a dose-dependent manner through activation of PKC (28) via the $G_{q/11}$ class (27). In addition, its role in cellular responses include increased synthesis of DNA and cAMP, which are important in the induction and phenotype maintenance of ACTH-secreting tumors, are mediated through the recruitment of several pathways, including G_s , G_i , and $G_{q/11}$ (29).

2.3.4 Other receptors

The OTR can be considered a 'nonselective' VPR because the OTR has equal affinity for VP and OT, whereas the V_1R has a 30-fold higher affinity for VP than for OT. OTRs are functionally coupled to $G_{q/11}$ class binding proteins, which stimulate the activity of phospholipase C (29).

VP was demonstrated to act on the P_2 class of purinoceptors (P_2Rs) (30). P_2Rs also belong to the seven-transmembrane-domain GPCR superfamily. VP was shown to exert cardiac effects through activation of P_2Rs expressed on

cardiac endothelium (30).

3. Vasopressin in osmotic and cardiovascular homeostasis

The role of VP in osmotic and cardiovascular homeostasis is well established in the literature. Under normal physiological conditions, the secretion of VP facilitates water reabsorption by the kidney and the contraction of smooth muscle cells in arteries (31).

This hormone has been used as an antidiuretic in the treatment of *diabetes insipidus*, in shock therapy and in cardiovascular treatment for over a hundred years. For review, see Holmes *et al.* (2003) (16); the shock states can induce a 200-fold increase in VP levels, and these supraphysiologic levels cause profound vasoconstriction, helping to maintain end-organ perfusion. Prolonged shock is associated with a decrease in VP levels, likely due to the depletion of VP stores, and may contribute to the refractory hypotension that is observed in advanced shock states.

VP deficiency exists in some shock states, and the replacement of physiologic levels of VP can restore vascular tone. The infusion of low-dose VP in patients who have vasodilatory shock decreases norepinephrine dose requirements, maintains blood pressure and cardiac output, decreases pulmonary vascular resistance, and increases urine output. Under these circumstances, low-dose VP could improve renal and other organ function in septic shock (32).

VP has also been demonstrated to cause vasodilation in some vascular beds, distinguishing this hormone from other vasoconstrictor agents. VP may restore vascular tone in vasodilatory shock states via the V_1R (33) by blunting the increase in cGMP that is induced by nitric oxide (34) and natriuretic peptide (35), and by decreasing the synthesis of inducible nitric oxide synthase that is stimulated by lipopolysaccharide (34).

The mechanism of vasodilation has been demonstrated to be due to the activation of endothelial OTRs (36), which in turn trigger the activation of endothelial isoforms of nitric oxide synthase. VP causes vasoconstriction or vasodilation depending of the vascular bed studied (37), of the receptor density such as V_1R or OTR, of the studied model, of the dose (14), and of the duration of exposure to the hormone (38).

The actions of VP on the heart are complex, and the studies are seemingly

contradictory. Depending on the species studied, the dose used, and the experimental model, VP can cause coronary vasoconstriction or vasodilation and exert positive or negative inotropic effects. In addition to its vascular effects on coronary blood flow, VP also has metabolic effects on the heart (39).

VP is a unique vasoactive hormone that is important in the control of vascular tone and has myocardial effects. VP can restore vascular tone in refractory vasodilatory shock states due to V_1R activation of KATP channels, inhibitory action on nitric oxide, and the potentiation of endogenous vasoconstrictors. While *in vivo* and *in vitro* studies suggest that VP may have negative inotropic and coronary vasoconstrictor properties, clinical studies of low-dose VP to date have not observed adverse cardiac effects of VP. In refractory shock states, the administration of VP in low, physiologic doses has been associated with impressive stabilization of hemodynamics (40).

Currently, most research on VP function has focused on its peripheral actions on fluid homeostasis via the V_2R and blood pressure control via the V_{1a} receptor ($V_{1a}R$) (41).

4. Vasopressin and synaptic plasticity

The neuropeptides VT/VP influence a variety of sex-typical and species-specific behaviors and provide an integrational neural substrate for the dynamic modulation of those behaviors by endocrine and sensory stimuli. They have been shown to influence many types of social behaviors in a wide range of species and have been the focus of many neuroanatomical studies of its distribution and targets in the central nervous system (6,42).

In vertebrates, the social behaviors that are modulated by VT and VP fall into the general categories of reproduction, aggression, pair-bonding, parental care, and smell-recognition behaviors (42). In different species, specific types of reproductive behaviors enhanced by VT/VP administration include spawning behavior in killifish, phonotaxis in female anurans, sexual receptivity in female frogs, courtship and mating behaviors in male newts, mating behaviors in male birds, mating behaviors in male rabbits, and lordosis in female rats and hamsters (6).

Previous studies showed that VT/VP modulates specific types of vocalization in reproduction that include chirps by male weakly electric fish, motor

correlates of singing in plainfin midshipman fish (43), advertisement and territorial calls in male anurans (44), advertisement and territorial calls in male quail, canaries, and sparrows, and vocalizations by rats and squirrel monkeys (45).

VT or VP administration also enhances smell-recognition behaviors in newts, hamsters, squirrel monkeys, and musk shrews and enhances pair-bonding behaviors in male voles (45,46). After reviewing these behavioral responses to VT and VP peptides, Goodson & Bass (2001) (42) concluded that in each case, VT/VP influences physical spacing between conspecifics, even though the direction of the effect differs greatly depending on specific attributes of a species' social organization. Study in rats suggests that vasopressin neurons may also play an important role in the coding of social odour information. Because this filtering is important for social recognition, it seems that the vasopressin release must depend on previous olfactory experience (47). Notwithstanding, the vasopressin given intranasally in rats had no significant effects on social recognition or short-term recognition memory (48).

Behavioral studies suggest that the effects of VT and VP are mediated by V_1 -like receptors. The pair bonding behaviors in male prairie voles are enhanced by VP agonists and suppressed by V_1 receptor antagonists (46). In fish and amphibians, it was also found that V_1 agonists enhance and V_1 antagonists suppress specific social behaviors (49).

Sex steroid hormones are involved in regulating many of the same behaviors as VT/VP peptides. Social behaviors that are affected by VT and VP peptides overlap with social behaviors that are under the influence of testicular androgens. Experiments show that behavioral responses to VT/VP administration are steroid dependent. For example, gonadectomy reduces and androgen replacement restores the effectiveness of VT or VP administration to enhance courtship behaviors in newts, offensive aggression in hamsters (50), and paternal behaviors in voles (51).

Androgens act on this peptide system, which is indicated by the sexual dimorphism in the distribution of VT and VP peptides that occurs in specific sites in the brains of various vertebrates (6,42,52). Gonadal steroids appear to affect the abundance and distribution of VT/VP receptors in specific brain areas (50). Sexual differences in VP binding and V_1 receptor mRNA have been found in amphibians and mammals (50,53). It is clear that the actions of gonadal steroids on VT and VP

systems are complex, with the responses to gonadal steroids being specific to species, sex, and site.

4.1 V₁ receptor role in social behavior

Considerable evidence suggests that VP is critically involved in the regulation of many social and nonsocial behaviors (54). The existence of two VP receptors in the brain, namely the V_{1a}R and V_{1b}R subtypes, and the lack of clear pharmacological data using selective agonists or antagonists make it difficult to determine which receptor is responsible for the VP-mediated effects on behavior. The V_{1a}R has been thought to play the dominant role in regulating behavior (55).

The biological complexity of monogamy can be reduced to differences in V_{1a}R distribution in the male brain, which underlies the formation of female partner preference through olfactory reward (55). V_{1a}R knockout (V_{1a}RKO) mice have been generated, and olfactory investigation tests have revealed that males exhibit markedly reduced anxiety-like behavior and impaired social recognition (56). V_{1a}R antagonists induce marked effects on learning, memory, and social behaviors.

The role of V_{1a}R in social recognition is more consistent than the anxiety data, with most pharmacological investigations of V_{1a}R antagonists resulting in impaired social recognition (57). In rats, VP agonists have a facilitating effect on social memory and can prolong social recognition for up to 120 min. Normal social recognition lasts between 30 and 60 min, and the facilitating effects of VP administration appear to improve the consolidation of social memory if it occurs after the initial encounter (58). Increased expression of the V_{1a}R in the lateral septum using viral vector gene transfer results in a similar facilitation of social recognition (59).

Bielsky *et al.* (2004) (56) demonstrated that V_{1a}RKO mice have a profound deficit in social recognition, providing definitive evidence that the V_{1a}R is critical for social recognition. This social deficit is not a result of a general olfactory deficiency, given the ability of these animals to habituate to a nonsocial stimulus. This finding suggests that olfactory learning in V_{1a}RKO mice is intact, and the specific deficit is in the learning and recall of social cues. These results suggest that V_{1a}Rs are either involved in the proper processing of olfactory cues or pheromones used to identify individuals or perhaps in the context-specific learning or recall of social olfactory memories. Behavioral studies suggest that vasopressin

neurons may also play an important role in the coding of social odour information. Because this filtering is important for social recognition, it seems that the vasopressin release must depend on previous olfactory experience (47).

The inability to clearly discern the role of the $V_{1a}R$ in anxiety from the results of pharmacological investigations and the confounding results from investigations into the $V_{1b}R$ have prompted the current studies with $V_{1a}RKO$ mice. The significantly reduced anxiety-like behaviors observed in $V_{1a}RKO$ mice provide additional, non-pharmacological support for the role of the $V_{1a}R$ in regulating anxiety behavior. The $V_{1a}R$ antagonists used in many of these studies are known to have low affinities for the $V_{1b}R$, and therefore, it is conceivable that some of the behavioral effects produced by these compounds could be due to their effects on the $V_{1b}R$ (56).

Studies using in situ hybridization and immunohistochemical assays suggest that the $V_{1b}R$ is not strictly localized to the pituitary but may be widely distributed in the brain (60). The data supporting the role of the $V_{1b}R$ in social recognition and anxiety are sparse and inconsistent. Studies employing pharmacological antagonists have suggested that the $V_{1b}R$ may play a role in regulating anxiety, but this finding is not supported with knockout mice, although they do show a reduction in aggressive behavior. Treatment with a $V_{1b}R$ antagonist results in reduced anxiety-related behavior, while the characterization of a $V_{1b}R$ knockout ($V_{1b}RKO$) mouse found no difference in anxiety-related behavior but did find mildly impaired social recognition (61).

Liebsch *et al.* (1996) (62) found no effect of VP on anxiety-related behavior but did find a decrease in anxiety-related behavior after treatment with a V_1R antagonist. Appenrodt *et al.* (1998) (63) reported a decrease in anxiety-related behavior after central or peripheral VP administration but no effect of a VP antagonist. The VPR antagonist increased anxiety-like behavior (62,63). The $V_{1b}R$ has also been implicated in anxiety, and treatment with a $V_{1b}R$ antagonist resulted in a decrease in anxiety-related behavior in rats (64). However, this finding was contradicted by a report that $V_{1b}RKO$ mice do not show any changes in anxiety-related behavior (61).

VP and their receptors, which have been shown to mediate social recognition in rodents and are both under the control of sex hormones (65), or either of the V_1R results in specific social recognition deficits (66,67), while VP

administration improves social recognition in both sexes (68). Nevertheless, VP antiserum or antagonist administration blocked male but not female social recognition (69). It is also possible to induce pair bonding in both male mice and promiscuous male voles by introducing the monogamous prairie vole $V_{1a}R$ gene into the ventral forebrain or central nervous system (70), although variations in the $V_{1a}R$ gene may not be sufficient or necessary for this type of mating behavior in voles and deer mice (71).

Within-species variations in hormones and their receptors are also linked to social behaviors; voles that spent more time investigating a novel female and did not habituate had more $V_{1a}R$ and less OTR in the septum (72). Higher VP and OT mRNA levels in the medial preoptic area could facilitate social recognition by releasing more VP and OT into the lateral amygdala, thus facilitating social recognition, as both the dorsolateral septum and the amygdala receive projections from hypothalamic OT and VP expressing neurons (73).

The results of Clipperton-Allen *et al.* (2012) (74) support the idea that variation in ovarian hormones could be related to individual differences in social recognition, at least partly through modulation of the VP and/or OT systems, particularly in the dorsolateral septum, lateral amygdala and medial preoptic area. As mRNA levels do not always reflect differences in protein levels, it should be noted that additional studies are necessary to determine how the observed differences in gene expression relate to levels of receptors and/or hormones and whether these occur in the same brain regions as the mRNA changes or in regions to which they project.

A previous study provided direct evidence that the $V_{1a}R$ is critical in olfactory social recognition and anxiety-like behavior (56). These results support previous reports of the importance of the VP system in these behaviors and may have clinical relevance to the understanding and treatment of similar corresponding disorders in humans. Autism, with its hallmark disturbances in social behavior, has been associated with polymorphisms in the $V_{1a}R$ gene (75), suggesting that modulation of this receptor and the VP system may provide novel therapeutic targets for psychiatric disorders associated with social impairment, such as autism, as well as affective disorders such as anxiety disorder. Social recognition in rodents is a specific olfactory task and is supported by a clear olfactory circuit important in such species. The effects of VP in social recognition

may not generalize to social engagement in humans, and furthermore, the effects of $V_{1a}R$ modulation on anxiety-related behavior might confound the use of VP-focused treatment for social disorders and vice versa. Nevertheless, the disparate effects of $V_{1a}R$ activation on social and anxiety-related behavior may be mediated by different neural circuits, and VP-focused treatment for one disorder could possibly be separated from effects on other circuits. It is also possible, as discussed previously, that VP's effects on social recognition and anxiety-related behaviors are a result of changes in the internal environment, and VP may have a more permissive effect on arousal states. The studies of Bielsky et al. (56) suggest that the modulation of the vasopressinergic system may provide a fresh strategy for the treatment of social and affective disorders, and further investigation may prove the $V_{1a}R$ and VP systems to be clinically relevant to these disorders.

In conclusion, the lineage for VP or VP-like neuropeptides is evolutionarily stable and present in all vertebrate species. The role of VP in osmotic and cardiovascular homeostasis is well established in the literature; however, the neuropeptides VT/VP are also critically involved in the modulation of social behaviors in a wide range of species. In vertebrates, the social behaviors that are modulated by VT and VP fall into the general categories of reproduction, aggression, pair-bonding, parental care, and smell-recognition behaviors. Behavioral studies suggest that the effects of VT/VP are mediated by V_1 -like receptors. The $V_{1a}R$ has been thought to play the dominant role in regulating behavior.

References

1. Hoyle CH. Neuropeptide families and their receptors: evolutionary perspectives. *Brain Research* (1999) 848(1-2):1-25. doi: 10.1016/S0006-8993(99)01975-7
2. Acher R, Chauvet J, Chauvet MT. Man and the chimaera. Selective versus neutral oxytocin evolution. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (1995) 395:615–627. PMID:8714026 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8714026>
3. Gilligan P, Brenner S, Venkatesh B. Neurone-specific expression and regulation of the pufferfish isotocin and vasotocin genes in transgenic mice. *Journal of Neuroendocrinology* (2003) 15:1027-1036. doi: 10.1046/j.1365-2826.2003.01090.x
4. Van Kesteren RE, Tensen CP, Smit AB, Van Minnen J, Kolakowski Lf, Meyerhof W, *et al.* Co-evolution of ligand–receptor pairs in the vasopressin/oxytocin superfamily of bioactive peptides. *The Journal of Biological Chemistry* (1996) 271:3619–3626. doi: 10.1074/jbc.271.7.3619
5. Warne JM. Cloning and characterization of an arginine vasotocin receptor from the euryhaline flounder *Platichthys flesus*. *General and Comparative Endocrinology* (2001) 122:312–319. doi:10.1006/gcen.2001.7644
6. Rose JD, Moore FL. Behavioral neuroendocrinology of vasotocin and vasopressin and the sensorimotor processing hypothesis. *Frontiers in Neuroendocrinology* (2002) 23: 317–341. doi: 10.1016/S0091-3022(02)00004-3
7. Ludwig M. Dendritic release of vasopressin and oxytocin. *Journal of Neuroendocrinology* (1998) 10(12):881-95. doi: 10.1046/j.1365-2826.1998.00279.x
8. Oliver H, Schaefer EA. On the physiological action of extracts of the pituitary body and certain other glandular organs. *The Journal of Physiology* (1895) 18:277–279. doi: 10.1113/jphysiol.1895.sp000565
9. von den Velden R. The renal effects of hypophyseal extract in humans [in German]. *Berl Klin Wochenschr* (1913) 50:2083–2086.
10. Turner RA, Pierce JG, Du Vigneaud V. The purification and the amino acid content of vasopressin preparation. *The Journal of Biological Chemistry* (1951) 191:21-28. <http://www.jbc.org/content/191/1/21>
11. Riddell DC, Mallonee R, Phillips JA, Parks JS, Sexton LA, Hamerton, JL. Chromosomal assignment of human sequences encoding arginine vasopressin-neurophysin II and growth hormone releasing factor. *Somatic Cell and Molecular Genetics* (1985) 11(2): 189–195. PMID: 2984790. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2984790>
12. Sausville E, Carney D, Battey J. The human vasopressin gene is linked to the oxytocin gene and is selectively expressed in a cultured lung cancer cell line. *The Journal of Biological Chemistry* (1985) 260: 10236–10241. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5002\(86\)80027-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5002(86)80027-7)

13. Caldwell HK, Lee HJ, Macbeth AH, Young III WS. Vasopressin: behavioral roles of an “original” neuropeptide. *Progress in Neurobiology* (2008)84:1-24. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.10.007.
14. Holmes CL, Patel BM, Russell JA, Walley KR. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. *Chest* (2001) 120(3):989-1002. doi:10.1378/chest.120.3.989
15. Antoni FA. Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Frontiers in Neuroendocrinology* (1993) 14:76-122. doi:10.1006/frne.1993.1004
16. Holmes CL, Landry DW, Granton JT. Science Review:Vasopressin and the cardiovascular system part-I – receptor physiology. *Critical Care*. (2003) 7:427-34. doi:10.1186/cc2338
17. Barberis C, Mouillac B, Durroux T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *Journal of Endocrinology* (1998) 156:223–229. doi: 10.1677/joe.0.1560223
18. Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science* (2002) 296(5573):1636-1639. doi: 10.1126/science.1071550
19. Berrada K, Plesnicher CL, Luo X, Thibonnier M. Dynamic interaction of human vasopressin/oxytocin receptor subtypes with G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C after agonist stimulation. *The Journal of Biological Chemistry* (2000) 275(35):27229-37. doi: 10.1074/jbc.M002288200
20. Ross EM, Gilma AG. Biochemical properties of hormone sensitive adenylate cyclase. *Annual Reviews of Biochemistry* (1980) 49:533–564. PMID:6105841 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6105841>
21. Filep J, Rosenkranz B. Mechanism of vasopressin-induced platelet aggregation. *Thrombosis Research* (1987) 45:7-15. doi:10.1016/0049-3848(87)90252-0
22. Phillips PA, Abrahams JM, Kelly JM, Mooser V, Trinder D, Johnston CI. Localization of vasopressin binding sites in rat tissues using specific V₁ and V₂ selective ligands. *Endocrinology* (1990) 126:1478-1484. doi: 10.1210/endo-126-3-1478
23. Birnbaumer M. Vasopressin receptors. *Trends in Endocrinology & Metabolism* (2000) 11:406-410. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1043-2760\(00\)00304-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00304-0)
24. Harris HW Jr, Zeidel ML, Jo I, Hammond TG. Characterization of purified endosomes containing the antidiuretic hormone-sensitive water channel from rat renal papilla. *The Journal of Biological Chemistry* (1994) 269:11993-12000. PMID:8163502 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8163502>

25. Knepper MA, Inoue T. Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin. *Current Opinion in Cell Biology* (1997) 9:560-564. PMID:9261056 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9261056>
26. Bichet DG, Razi M, Lonergan M, Arthus MF, Papukna V, Kortas C, Barjon JN. Hemodynamic and coagulation responses to 1-desamino [8-D-arginine] vasopressin in patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus. *New England Journal of Medicine* (1988) 318: 881-887. doi: 10.1056/NEJM198804073181403
27. Thibonnier M, Preston JA, Dulin N, Wilkins PL, Berti-Mattera LN, Mattera R. The human V₃ pituitary vasopressin receptor: ligand binding profile and density-dependent signaling pathways. *Endocrinology* (1997) 138:4109-4122. doi: 10.1210/en.138.10.4109
28. Liu JP, Engler D, Funder JW, Robinson PJ. Arginine vasopressin (AVP) causes the reversible phosphorylation of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein in the ovine anterior pituitary: evidence that MARCKS phosphorylation is associated with adrenocorticotropin (ACTH) secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology* (1994) 101:247-256. PMID:9397959 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9397959>
29. Peter J, Burbach H, Adan RA, Lolait SJ, van Leeuwen FW, Mezey E, Palkovits M, Barberis C. Molecular neurobiology and pharmacology of the vasopressin/oxytocin receptor family. *Cellular and Molecular Neurobiology* (1995) 15:573-595. doi: 10.1007/BF02071318
30. Zenteno-Savin T, Sada-Ovalle I, Ceballos G, Rubio R. Effects of arginine vasopressin in the heart are mediated by specific intravascular endothelial receptors. *European Journal of Pharmacology* (2000) 410(1):15-23. doi: 11134652
31. Barberis C, Tribollet E. Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. *Critical Reviews of Neurobiology* (1996) 10:119-154. PMID:8853957 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8853957>
32. Holmes CL, Walley KR. Arginine vasopressin in the treatment of vasodilatory septic shock. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* (2008) 22(2): 275-286. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpa.2008.03.002>
33. Tamaki T, Kiyomoto K, He H, Tomohiro A, Nishiyama A, Aki Y *et al.* Vasodilation induced by vasopressin V₂ receptor stimulation in afferent arterioles. *Kidney International* (1996) 49:722-729. doi: 10.1038/ki.1996.101
34. Umino T, Kusano E, Muto S, Akimoto T, Yanagiba S, Ono S *et al.* AVP inhibits LPS- and IL-1 β -stimulated NO and cGMP via V₁ receptor in cultured rat mesangial cells. *American Journal of Physiology* (1999) 276:F433-F441. <http://ajprenal.physiology.org/content/ajprenal/276/3/F433>
35. Nambi P, Whitman M, Gessner G, Aiyar N, Crooke ST. Vasopressin-mediated inhibition of atrial natriuretic factor-stimulated cGMP accumulation in an

- established smooth muscle cell line. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of American* (1986) 83:8492–8495. doi: 10.1073/pnas.83.22.8492
36. Thibonnier M, Conarty DM, Preston JA, Plesnicher CL, Dweik RA, Erzurum SC. Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. *Endocrinology* (1999) 140:1301–1309. doi: 10.1210/en.140.3.1301
 37. Garcia-Villalon AL, Garcia JL, Fernandez N, Monge L, Gomez B, Dieguez G. Regional differences in the arterial response to vasopressin: role of endothelial nitric oxide. *British Journal of Pharmacology* (1996) 118:1848–1854. doi: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15613.x
 38. Liard JF. Does vasopressin-induced vasoconstriction persist during prolonged infusion in dogs? *American Journal of Physiology* (1987) 252:R668–R673. PMID:3565599 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3565599>
 39. Boyle WA 3rd, Segel LD. Direct cardiac effects of vasopressin and their reversal by a vascular antagonist. *American Journal of Physiology* (1986) 251:H734-H741. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3766750>
 40. Holmes CL, Landry DW, Granton JT. Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 – clinical physiology. *Critical Care* (2004) 8:15-23 doi: 10.1186/cc2338)
 41. Fernández N, García JL, García-Villalón AL, Monge L, Gómez B, Diéguez G. Coronary vasoconstriction produced by vasopressin in anesthetized goats. Role of vasopressin V₁ and V₂ receptors and nitric oxide. *European Journal of Pharmacology* (1998) 342:225-233. doi: 10.1016/S0014-2999(97)01504-5
 42. Goodson JL, Bass AH. Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. *Brain Research Reviews* (2001) 35:246–265. doi: 10.1016/S0165-0173(01)00043-1
 43. Bastian J, Schniederjan S, Nguyenkim J. Arginine vasotocin modulates a sexually dimorphic communication behavior in the weakly electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *The Journal of Experimental Biology* (2001) 204:1909–1923. PMID:11441033 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11441033>
 44. Propper CR, Dixon TB. Differential effects of arginine vasotocin and gonadotropin-releasing hormone on sexual behaviors in an anuran amphibian. *Hormones and Behavior* (1997) 32: 99–104. doi:10.1006/hbeh.1997.1408
 45. Winslow J, Insel TR. Vasopressin modulates male squirrel monkeys behavior during social separation. *European Journal of Pharmacology* (1991) 200:95–101. doi:10.1016/0014-2999(91)90671-C
 46. Winslow JT, Hastings N, Carter CS, Harbaugh CR, Insel TR. A role for central vasopressin in pair bonding in monogamous prairie voles. *Nature* (1993) 365:545–548. doi:10.1038/365545a0

47. Ludwig M. Vasopressin and the olfactory system. *Endocrine Abstracts* (2011) 25 S7.1.ISSN 1479-6848. <http://www.endocrine-abstracts.org/ea/0025/ea0025s7.1.htm>
48. Ludwig M, Tobin VA, Callahan MF, Papadaki E, Becker A, Engelmann M *et al.* Intranasal application of vasopressin fails to elicit changes in brain immediate early gene expression, neural activity and behavioural performance of rats. *Journal of Neuroendocrinology* (2013) 25(7):655-67. doi: 10.1111/jne.12046.
49. Semsar K, Kandel FL, Godwin J. Manipulations of the AVT system shift social status and related courtship and aggressive behavior in the bluehead wrasse. *Hormones and Behavior* (2001) 40: 21–31. doi:10.1006/hbeh.2001.1663
50. Delville Y, Mansour KM, Ferris CF. Testosterone facilitates aggression by modulating vasopressin receptors in the hypothalamus. *Physiology & Behavior* (1996) 60:25–29. doi: 10.1016/0031-9384(95)02246-5
51. Wang Z, De Vries GJ. Testosterone effects on paternal behavior and vasopressin immunoreactive projections in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Brain Research* (1993) 631:156–160. doi:10.1016/0006-8993(93)91203-5
52. Grossmann R, Jurkevich A, Kohler A. Sex dimorphism in the avian arginine vasotocin system with special emphasis to the bed nucleus of the stria terminalis. *Comparative Biochemistry Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* (2002) 131:833–837. doi:10.1016/S1095-6433(02)00021-1
53. Young LJ, Wang Z, Cooper TT, Albers HE. Vasopressin (V_{1a}) receptor binding, mRNA expression and transcriptional regulation by androgen in the Syrian hamster brain. *Journal of Neuroendocrinology* (2000) 12:1179–1185. doi: 10.1046/j.1365-2826.2000.00573.x
54. Lucion AB, Bortolini MC. Mother–Pup Interactions: Rodents and Humans. *Frontiers in Endocrinology* (2014) 5:17. doi:10.3389/fendo.2014.00017
55. Keverne EB, Curley JP. Vasopressin, oxytocin and social behavior. *Current Opinion in Neurobiology* (2004) 14:777–783. doi: 10.1016/j.conb.2004.10.006
56. Bielsky I, Bao-Hu S, Szegda K, Westphal H, Young L. Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V_{1a} receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* (2004) 29:483-493. doi:10.1038/sj.npp.1300360
57. Ferguson JN, Young LJ, Insel TR. The neuroendocrine basis of social recognition. *Frontiers in Neuroendocrinology* (2002) 23(2):200–224. doi: 10.1006/frne.2002.0229
58. Le Moal M, Dantzer R, Michaud B, Koob GF. Centrally injected arginine vasopressin (AVP) facilitates social memory in rats. *Neuroscience Letters* (1987) 77(3):353–359. doi: 10.1016/0304-3940(87)90527-1

59. Landgraf R, Frank E, Aldag JM, Neumann ID, Ren X, Terwilliger EF *et al.* Viral vector-mediated gene transfer of the vole V_{1a} vasopressin receptor in the rat septum: improved social discrimination and active social behavior. *European Journal of Neuroscience* (2003) 18:403–411. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02750.x
60. Hernando F, Schoots O, Lolait SJ, Burbach JPH. Immunohistochemical localization of the vasopressin V_{1b} receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinology* (2001) 142:1659–1668. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/endo.142.4.8067>
61. Wersinger SR, Ginns EI, O'Carroll AM, Lolait SJ, Young WS 3rd. Vasopressin V_{1b} receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. *Molecular Psychiatry* (2002) 7:975–984. doi: 10.1038/sj.mp.4001195
62. Liebsch G, Wotjak CT, Landgraf R, Engelmann M. Septal vasopressin modulates anxiety-related behaviour in rats. *Neuroscience Letters* (1996) 217:101–104. doi: 10.1016/0304-3940(96)13069-X
63. Appenrodt E, Schnabel R, Schwarzberg H. Vasopressin administration modulates anxiety-related behavior in rats. *Physiology & Behavior* (1998) 64:543–547. doi: 10.1016/S0031-9384(98)00119-X
64. Griebel G, Simiand J, Gal CS-L, Wagnon J, Pascal M, Scatton B *et al.* Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V_{1b} receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of American* (2002) 99:6370–6375. doi: 10.1073/pnas.092012099
65. Choleris E, Clipperton-Allen AE, Phan A, Kavaliers M. Neuroendocrinology of social information processing in rats and mice. *Frontiers in Neuroendocrinology* (2009) 30:442–459. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.05.003
66. DeVito LM, Konigsberg R, Lykken C, Sauvage M, Young III WS, Eichenbaum H. Vasopressin 1b receptor knock-out impairs memory for temporal order. *Journal of Neuroscience* (2009) 29:2676–2683. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5488-08.2009
67. Hitti FL, Siegelbaum SA. The Hippocampal CA2 Region is Essential for Social Memory. *Nature*. (2014) 508:88–92. doi:10.1038/nature13028
68. Roper JA, O'Carroll A-M, Young WSI, Lolait SJ. The vasopressin Avpr1b receptor: molecular and pharmacological studies. *Stress*. (2011) 14:98–115. doi: 10.3109/10253890.2010.512376
69. Bluthé R-M, Schoenen J, Dantzer R. Androgen-dependent vasopressinergic neurons are involved in social recognition in rats. *Brain Research* (1990) 519:150–157. doi: 10.1016/0006-8993(90)90073-K

70. Cushing BS, Wynne-Edwards KE. Estrogen receptor- α distribution in male rodents is associated with social organization. *Journal of Comparative Neurology* (2006) 494:595–605. doi: 10.1002/cne.20826
71. Turner LM, Young AR, Römpler H, Schöneberg T, Phelps SM, Hoekstra HE. Monogamy evolves through multiple mechanisms: evidence from V_{1a}R in deer mice. *Molecular Biology of Evolution* (2010) 27:1269–1278. doi: 10.1093/molbev/msq013.
72. Ophir AG, Zheng D-J, Eans S, Phelps SM. Social investigation in a memory task relates to natural variation in septal expression of oxytocin receptor and vasopressin receptor 1a in prairie voles (*Microtus ochrogaster*) *Behavioral Neuroscience* (2009) 123:979–991. doi: <http://dx.doi.org/10.1037/a0016663>
73. Rood BD, De Vries GJ. Vasopressin innervation of the mouse (*Mus musculus*) brain and spinal cord. *Journal of Comparative Neurology* (2011) 519:2434–2474. doi: 10.1002/cne.22635.
74. Clipperton-Allen AE, Lee AW, Reyes A, Devidze N, Phan A, Pfaff DW *et al.* Oxytocin, vasopressin and estrogen receptor gene expression in relation to social recognition in female mice. *Physiology & Behavior* (2012) 105(4):915–924. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.10.025
75. Kim S-J, Young LJ, Gonen D, Veenstra-VanderWeele J, Courchesne R, Courchesne E *et al.* Transmission disequilibrium testing of arginine vasopressin receptor 1A (AVPR1A) polymorphisms in autism. *Molecular Psychiatry* (2002) 7:503–507. doi: 10.1038/sj.mp.4001125