MIGUEL JOSÉ RANGEL JUNIOR

**MAPEAMENTO ANÁTOMO-FUNCIONAL DOS SÍTIOS NEURAIS ENVOLVIDOS
NAS RESPOSTAS OBSERVADAS DURANTE EXPOSIÇÃO AO AMBIENTE
CONTEXTUAL DE UMA DERROTA SOCIAL**

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

São Paulo
2012

MIGUEL JOSÉ RANGEL JUNIOR

**MAPEAMENTO ANÁTOMO-FUNCIONAL DOS SÍTIOS NEURAIS ENVOLVIDOS
NAS RESPOSTAS OBSERVADAS DURANTE EXPOSIÇÃO AO AMBIENTE
CONTEXTUAL DE UMA DERROTA SOCIAL**

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

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientador: Prof Dr. Newton Sabino Canteras

Versão original

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Rangel Junior, Miguel José.

Mapeamento anátomo-funcional dos sítios neurais envolvidos nas respostas observadas durante exposição ao ambiente contextual de uma derrota social / Miguel José Rangel Junior. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Newton Sabino Canteras.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Bases neurais dos comportamentos motivados.

Versão do título para o inglês: Anatomic and functional mapping of the neural sites involved in the observed responses during the exposition of the environment of a social defeat.

1. Hipotálamo 2. Paradigma residente/intruso 3. Derrota social
4. Comportamento defensivo animal 5. Neurociência 6. Sistema nervoso I. Canteras, Prof. Dr. Newton Sabino II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0108/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Miguel José Rangel Junior.

Título da Dissertação: Mapeamento anátomo-funcional dos sítios neurais envolvidos nas respostas observadas durante exposição ao ambiente contextual de uma derrota social.

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

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

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL

Decl. CEUA.027/10

DECLARAÇÃO

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

São Paulo, 08 de junho de 2010.

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

Dedico a minha mãe, Dalva, e a minha avó, Neusa, pois sem elas não conseguiria realizar esse trabalho.

Também dedico em memória de meu pai.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Newton Sabino Canteras, por sua orientação, por me guiar e dar a oportunidade de realizar esse trabalho em seu laboratório.

Aos professores, Jackson Cioni Bittencourt, Sara Joyce Shammah Lagnado e Luciano Freitas Felício que estiveram presentes durante o exame de qualificação e contribuíram imensamente para a finalização deste trabalho.

Aos professores presentes na banca examinadora de defesa, pela avaliação, leitura e atenção dispensada.

Aos membros do Laboratório de Neuroanatomia Funcional: Isadora, Wagner, Cláudia, Simone, Cibele pela companhia e discussões (científicas ou não). Para Simone e Cláudia, pelas discussões que foram muito úteis na interpretação e conclusões desse trabalho. E especialmente para o Miguel (Xará) pela amizade e por ajudar na obtenção das fotomicrografias das lâminas. E também aos antigos membros Sandra, Márcia, Cleyton, Raquel e Eduardo pelos ensinamentos e companhia quando havia acabado de entrar no laboratório.

A minha namorada, Carol, por sempre me ouvir e me apoiar nos momentos difíceis nessa estada em São Paulo.

A minha mãe, Dalva, que me apoiou de todas as formas, mesmo quando havia dificuldades extremas nesse apoio.

A minha avó, Neusa, pelo apoio financeiro e por acreditar em mim sempre.

Aos meus irmãos, Gabriel e Daniel, com os quais convivi e ajudaram a formar meu caráter.

A meu pai, Miguel, que mesmo inconscientemente, cultivou em mim a busca e o prazer no conhecimento científico.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo indispensável auxílio financeiro (processo 2010/03741-3).

RESUMO

RANGEL JR, M. J. R. **Mapeamento Anátomo-funcional dos sítios neurais envolvidos nas respostas observadas durante exposição ao ambiente contextual de uma derrota social.** 2012. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Relações sociais entre machos de muitas espécies se dão na apresentação de comportamentos agressivos, definindo um ganhador e um perdedor. O macho perdedor pode apresentar comportamentos de defesa ao ambiente em que foi derrotado. Porém, falta um paradigma que nos permita observar fielmente os comportamentos de defesa no ambiente em que o animal foi derrotado e pouco é conhecido acerca dos sítios neurais envolvidos nestas repostas. Neste trabalho elaboramos um paradigma comportamental que nos permitisse quantificar os comportamentos de defesa ao contexto de uma derrota social, e também fizemos um mapeamento sistemático das estruturas envolvidas nas respostas contextuais da defesa social. Para a observação comportamental, utilizou-se um aparato em que consistia de uma caixa moradia do animal intruso ligada a uma outra caixa por um corredor. Assim, os intrusos foram habituados por 10 dias a esse aparato, com a outra caixa contendo apenas maravalha limpa. No 11º dia o intruso foi exposto ao macho residente colocado na outra caixa, e derrotado por ele. Vinte e quatro horas após a derrota social, analisamos o comportamento e o padrão de expressão da proteína Fos no Sistema Nervoso Central em animais intrusos expostos ao contexto da derrota, em um grupo exposto apenas ao cheiro do residente e outro exposto apenas à maravalha limpa. Importante ressaltar que todos os animais apresentaram inequívocos comportamentos de defesa tanto durante a derrota social quanto durante a exposição ao contexto. No contexto, os animais derrotados apresentaram comportamentos de avaliação de risco, sendo que os animais controle exploraram livremente o aparato sem respostas de defesa evidentes. Com relação ao mapeamento dos sítios neurais ativos durante a exposição ao contexto, notamos um aumento do número de células imunorreativas à proteína Fos na parte pósterodorsal do núcleo medial da amígdala (MEApd), no septo lateral rostral (LSr), nos elementos do circuito sexualmente responsivos da zona medial do hipotálamo, na parte juxtadorsal da área hipotalâmica lateral (LHAjd), e na parte dorsomedial do núcleo pré-mamilar dorsal (PMDdm). Em conjunto, estas estruturas formam um circuito que integra pistas olfatórias e contextuais críticas para expressão da defesa contextual após a derrota social.

Palavras-chave: Derrota social. Paradigma residente/intruso. Comportamento de defesa. Circuitaria neural. Hipotálamo. Contexto.

ABSTRACT

RANGEL JR, M. J. R. **Anatomic and functional mapping of the neural sites involved in the observed responses during the exposition of the environment of a social defeat.** 2012. 53 p. Masters thesis (Morphofunctional Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

In the present work, we investigated the neural systems involved in the contextual defense to a social defeat. First, we established a protocol to observe contextual defensive responses in animals previously defeated by an aggressive conspecific. In this protocol, animals were kept ten days living in a apparatus composed by two cages (room and resident cages). On the 11th day animals were exposed to an aggressive conspecific and defeated in the resident cage. On the following day, animals were exposed to the apparatus, and contextual defensive responses were measured. These animals presented reliable defensive responses, characterized mostly by risk assessment behaviors. Next, we examined the pattern of Fos expression in the brains of these animals to determine the putative networks involved in the expression of contextual defensive responses to social defeat. Accordingly, increased Fos expression was found in posterodorsal part of the medial amygdalar nucleus (MEApd), rostral part of lateral septum (LSr), elements of the social responsive medial hypothalamic circuit (including, the medial preoptic nucleus, ventrolateral part of the ventromedial nucleus, tuberal part of the lateral hypothalamic area and ventral premammillary nucleus), the juxtadorsal part of the lateral hypothalamic area and the dorsomedial part of the dorsal premammillary nucleus (PDMdm). The data allowed us to outline a putative circuit involved in the expression of contextual defense to social defeat, and indicates that both innate and contextual defense to social threat apparently share the same neural circuits.

Keywords: Social defeat. Resident/intruder paradigm. Defensive behavior. Hypothalamus. Anxiety. Context.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3V – terceiro ventrículo

aco – comissura anterior

AHNr – núcleo hipotalâmico anterior, parte rostral

AHNI – núcleo hipotalâmico anterior, parte intermediária

AHNC – núcleo hipotalâmico anterior, parte caudal

BLAa – núcleo basolateral da amígdala, parte anterior

BLAp – núcleo basolateral da amígdala, parte posterior

BMAa – núcleo basolateral da amígdala, parte anterior

BMAp – núcleo basolateral da amígdala, parte posterior

BSTad – núcleo intersticial da estria terminal, parte anterodorsal

BSTav – núcleo intersticial da estria terminal, parte anteroventral

BSTpr – núcleo principal do núcleo intersticial da estria terminal

BSTif – núcleo interfascicular do núcleo intersticial da estria terminal

BSTtr – núcleo transverso do núcleo intersticial da estria terminal

CEAI – núcleo central da amígdala, parte lateral

CEAm – núcleo central da amígdala, parte medial

COAa – núcleo cortical da amígdala, parte anterior

DMHa – núcleo dorsomedial do hipotálamo, parte anterior

fx - fórnice

LA – núcleo lateral da amígdala

LHAd – área hipotalâmica lateral, parte dorsal

LHAjd – área hipotalâmica lateral, parte juxtadorsomedial

LHAtu – área hipotalâmica lateral, parte tuberal

LM – núcleo mamilar lateral

LSc – septo lateral, parte caudal

LSr – septo lateral, parte rostral

LSv – septo lateral, parte ventral

MEAad – núcleo medial da amígdala, parte anterodorsal

MEApv – núcleo medial da amígdala, parte posteroventral

MEApd – núcleo medial da amígdala, parte posterodorsal

MM - núcleo mamilar medial

MPN – núcleo preóptico medial

mtt – trato mamilotálâmico

och – quiasma óptico

opt – trato óptico

PA – núcleo posterior da amígdala

PAGcdl – substância cinzenta periaquedutal caudal, parte dorsolateral

PAGcdm – substância cinzenta periaquedutal caudal, parte dorsomedial

PAGcl – substância cinzenta periaquedutal caudal, parte lateral

PAGcvi – substância cinzenta periaquedutal caudal, parte ventrolateral

PAGrdl – substância cinzenta periaquedutal rostral, parte dorsolateral

PAGrdm – substância cinzenta periaquedutal rostral, parte dorsomedial

PAGrl – substância cinzenta periaquedutal rostral, parte lateral

PH – hipotálamo posterior

PMD – núcleo préamilar dorsal

PMDdm – núcleo préamilar dorsal, parte dorsomedial

PMDvi – núcleo préamilar dorsal, parte ventrolateral

PVHpm – núcleo paraventricular do hipotálamo, parte parvicelular medial

PVHpl – núcleo paraventricular do hipotálamo, parte parvicelular lateral

PVHm – núcleo paraventricular do hipotálamo, parte magnocelular

PMV – núcleo préamilar ventral

SQH – núcleo supraquiasmático

SUMm – núcleo supramamilar medial

VMHvi – núcleo ventromedial do hipotálamo, parte ventrolateral

VMHdm – núcleo ventromedial do hipotálamo, parte dorsomedial

VL – ventrículo lateral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático do aparato utilizado nos experimentos.	23
Figura 2 - Desenho experimental.	25
Figura 3 - Tempo gasto em cada um dos compartimentos do aparato do experimento no grupo Contexto (derrotado) e nos controle de Cheiro e Branco, quando na fase de “Contexto”.....	31
Figura 4 - Comportamentos observados no grupo Contexto (derrotado) e nos controles de Cheiro e Branco, quando na fase de “Contexto”.....	32
Figura 5 - Fotomicrografia de corte transversal de seções reagidas para proteína Fos nos níveis do núcleo septal rostral (A, D, G), núcleo medial da amígdala (B, E, H) e núcleo préóptico medial (C, F, I) nos animais derrotados expostos ao Contexto e nos dois grupos controle (Cheiro e Branco).	38
Figura 6 - Fotomicrografia de corte transversal de seções reagidas para proteína Fos nos níveis do núcleo ventromedial do hipotálamo (A, D, G), núcleo pré-mamilar ventral (B, E, H) e núcleo pré-mamilar dorsal (C, F, I) nos animais derrotados expostos ao Contexto e nos dois grupos controle (Cheiro e Branco).....	39
Figura 7 - Resultado da contagem de células imunorreativas para proteína Fos no núcleo pré-mamilar dorsal (PMD).....	40
Figura 8 - Aparato utilizado para os experimentos pilotos. Note ser apenas uma caixa plexiglas comum.	42
Figura 9 - Diagrama esquemático mostrando os sistemas neurais provavelmente envolvidos na expressão dos comportamentos de defesa na exposição ao ambiente contextual de uma derrota social.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Densidade de células imunorreativas para proteína Fos no Hipotálamo, Amígdala, BST, Septo Lateral e PAG em animais derrotados expostos ao contexto, e animais não derrotados expostos ao cheiro (controle de Cheiro) de um co-específico e ao ambiente sem cheiro de um co-específico (controle Branco).....	36
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Conceito e efeitos fisiológicos e comportamentais da derrota social	15
1.2 Paradigmas experimentais de estudo da derrota social	16
1.3 Reações de defesa condicionada após derrota social	17
1.4 Estudos funcionais dos sítios neurais envolvidos nas respostas de defesa na derrota social	18
1.5 Estudos funcionais dos sítios neurais envolvidos nas respostas de defesa ao contexto da derrota social	19
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Sujeitos	23
3.2 Aparato Experimental	23
3.3 Desenho Experimental e Paradigma Residente/Intruso	23
3.4 Laqueadura	25
3.5 Análise comportamental	25
3.6 Imunohistoquímica para Fos	27
3.7 Quantificação de células marcadas com Fos	28
3.8 Análise Estatística	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Dados comportamentais	30
4.1.1 Medidas Espaço-temporais (Figura 3)	30
4.1.2 Medidas Comportamentais (Figura 4)	31
4.2 Medidas de Densidade de células imunorreativas à proteína Fos (Tabela 1, Figuras 5 e 6)	32
4.2.1 Densidade de células imunorreativas à proteína Fos no Hipotálamo	33
4.2.2 Densidade de células imunorreativas à proteína Fos na Amígdala	34
4.2.3 Densidade de células imunorreativas à proteína Fos no BST	34
4.2.4 Densidade de células imunorreativas à proteína Fos no Septo Lateral	34
4.2.5 Densidade de células imunorreativas à proteína Fos na Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG)	35
4.3 Contagem de células imunorreativas para proteína Fos no núcleo préamilar dorsal (PMD) (Figura 7)	40

5 DISCUSSÃO	41
5.1 Dados comportamentais.....	41
5.2 Dados de células imunorreativas à proteína Fos	43
6 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Conceito e efeitos fisiológicos e comportamentais da derrota social

As relações entre co-específicos são cruciais para sobrevivência e reprodução dos organismos. Em mamíferos, elas possuem um papel importantíssimo no contato sexual e na definição de territórios, notadamente entre indivíduos machos (para revisão, ver KREBS; DAVIES, 1996). Essa definição de território se dá de tal forma, que se manifesta em forma de agressividade, definindo um “vencedor” (dominante) e um “perdedor” (subalterno). O fenômeno que ocorre com o subalterno é definido como “derrota social” (para revisão, ver KREBS; DAVIES, 1996).

A derrota social possui uma série de efeitos no animal perdedor: ocorrem alterações neuroendócrinas e comportamentais marcantes (SAPOLSKY, 1982). Dentre as alterações neuroendócrinas destacam-se o aumento de catecolaminas e ACTH circulante no sangue, o que corresponde a um aumento no eixo HPA (Hipotálamo-Pituitária-Adrenal) e há uma diminuição na concentração de hormônios sexuais circulantes, notadamente a testosterona em indivíduos machos (BLANCHARD; YUDKO; BLANCHARD, 1993; BLANCHARD et al., 1993, 1995; HUHMAN et al., 1991; RAZZOLI et al., 2006, 2007; SAPOLSKY, 1982). Bartolomucci et al. (2005) mostraram também alterações no sistema imunológico, como, por exemplo, diminuição na atividade de células *natural killer* e proliferação de linfócitos in vitro, assim como diminuição na produção de citocinas e anticorpos. As alterações neuroendócrinas e imunológicas são respostas conhecidas de estresse (SAPOLSKY, 1982) e é importante ressaltar que tais alterações são suporte para a proposta de que a derrota social pode ser usada como modelo animal de depressão (KOOLHAAS et al., 1990, 1997; NESTLER et al., 2002). Alterações no ciclo circadiano também foram observadas, tal como um aumento da temperatura corporal na fase clara, e diminuição na atividade locomotora do animal na fase escura (MEERLO et al., 1996c).

Dentre as alterações comportamentais observadas, verifica-se uma redução da mobilidade no teste do campo aberto, anedonia (baixa resposta a estímulos reforçadores) e redução de comportamentos agressivos e sexuais (BLANCHARD et al., 1993, 1995; HUHMAN et al., 2003; KOOLHAAS et al., 1990, 1997; MEERLO et

al., 1996a, 1996b; POTEAL et al., 1993, STREKALOVA et al., 2004). Curiosamente, tais animais também possuem uma propensão maior à busca por álcool e drogas de abuso (BLANCHARD; YUDKO; BLANCHARD, 1993; HANEY et al., 1995).

Um dos fenômenos mais interessantes observados após a derrota social é a apresentação de comportamentos de defesa a qualquer co-específico, mesmo quando o animal derrotado encontra-se em seu próprio território (em caso de animais de laboratório, na sua própria caixa moradia). Potegal et al. (1993) descreveram tal fenômeno, denominando-o como derrota condicionada. O estudo da derrota condicionada e dos comportamentos de defesa que o animal apresenta a qualquer estímulo relacionado à derrota são importantes para compreensão da formação da memória referente a eventos aversivos. É importante ressaltar que a apresentação do contexto em que o animal sofreu a derrota é suficiente para desencadear a manifestação de comportamentos de defesa e as mudanças neuroendócrinas descritas anteriormente, como ativação do eixo HPA, mesmo que tal apresentação se dê vários dias após a derrota social (RAZZOLI et al., 2006, 2007).

1.2 Paradigmas experimentais de estudo da derrota social

Visto a importância da derrota social, tanto em um contexto etológico quanto em um contexto de estudo da fisiologia do estresse ou de vias neurais envolvidas nos comportamentos de defesa, existem inúmeros trabalhos realizados para estudá-la no laboratório. É interessante notar que muitos modelos utilizados atualmente para estudar a fisiologia e as vias neurais envolvidas nas respostas de defesa usam choques nas patas como estressor. Tais modelos possibilitam o estudo de comportamentos de defesa, mas em um contexto pouco fidedigno ao encontrado fora do ambiente do laboratório.

No estudo da derrota social, existem duas situações padrões para se estudá-la: colônias e díades. A primeira pode mimetizar o ambiente natural, sendo, portanto, formada por machos e fêmeas, ou ainda, ser formada por vários indivíduos do mesmo sexo (BLANCHARD et al., 1995; BLANCHARD; MCKITTRICK; BLANCHARD, 2001; MARTINEZ; CALVO-TORRENT; PICO-ALFONSO, 1998). Nestes experimentos, a hierarquia é estabelecida rapidamente por um macho

dominante, podendo haver, eventualmente, machos subdominantes (MARTINEZ; CALVO-TORRENT; PICO-ALFONSO, 1998). Neste caso, os subordinados são expostos a um estresse social crônico (MARTINEZ; CALVO-TORRENT; PICO-ALFONSO, 1998). Na segunda situação, há uma disputa direta entre dois machos, seja uma única vez, ou sucessivas vezes (BLANCHARD; MCKITTRICK; BLANCHARD, 2001). Tais animais podem se confrontar em “arenas”, que não é identificada como território para nenhum dos dois, e é estabelecida uma dominância a partir daí (KOLLACK-WALKER; WATSON; AKIL, 1997), ou um indivíduo residente em uma caixa moradia é exposto a um intruso (BLANCHARD; MCKITTRICK; BLANCHARD, 2001; MICZEK, 1979; MICZEK et al., 1992; MARTINEZ; CALVO-TORRENT; PICO-ALFONSO, 1998) (paradigma residente/intruso). No paradigma residente/intruso o macho residente convive isoladamente com uma fêmea sexualmente receptiva por um determinado período de tempo (mais ou menos três semanas) (MARTINEZ; CALVO-TORRENT; PICO-ALFONSO, 1998). A exposição ao intruso, então, é suficiente para desencadear comportamentos agressivos no residente, e em resposta, o intruso apresenta comportamentos defensivos, como o congelamento ou *freezing* (indivíduo se mantém totalmente imóvel) e a exposição do ventre para o agressor (posição *on-the-back*). Tais manifestações são interpretadas como “defesa passiva”. O intruso ainda apresenta reações de “defesa ativa”, como por exemplo, quando o animal se mantém nas patas traseiras e continuamente empurra o oponente (*upright defense*) e a fuga (*flight*) (MICZEK, 1979; MOTTA et al., 2009).

1.3 Reações de defesa condicionada após derrota social

Estudos usando o paradigma residente/intruso têm sido importantes para compreender as respostas de defesa condicionada observadas posteriormente à derrota social. Ratos derrotados apresentam um aumento na emissão de vocalização ultrasônica quando expostos aos agressores, mas não a ratos machos castrados e a fêmeas (CORRIGAN; FLANELLY, 1979) sugerindo uma memória não só apenas do evento aversivo, mas também de qual indivíduo que o derrotou. Neste trabalho, os animais eram expostos ao macho agressor dentro da caixa moradia do residente, mas separados por uma grade. Razzoli et al. (2006) montaram um paradigma parecido, mas os ratos passavam por uma sessão de condicionamento

em que eram derrotados três vezes. Ao estudar hamsters, Potegal et al. (1993) observaram um fenômeno denominado “derrota condicionada” e um paradigma em que os animais passavam por uma sessão de habituação à manipulação do experimentador, eram derrotados uma única vez e 24 horas depois eles eram expostos dentro de sua própria caixa moradia a um co-específico desconhecido e seu comportamento analisado e quantificado. A “derrota condicionada”, segundo Potegal et al. (1993), é a expressão de comportamentos de defesa a um co-específico não agressivo quando este último é colocado na caixa moradia do animal previamente derrotado.

Entretanto, deve ficar claro que muitos dos estudos relacionados ao que ocorre após a derrota social não visam estudar a “derrota condicionada” ou reações de defesa ao contexto da derrota. Eles visam muitas vezes observar alterações endócrinas e comportamentais a longo e curto prazo, sem se preocuparem com o fato de o animal lembrar ou não da experiência aversiva (BLANCHARD et al., 1993, 1995; KOOLHAAS et al., 1990, 1997; MEERLO et al., 1996a, 1996b; STREKALOVA et al., 2004).

É notável, também, a inúmera quantidade de procedimentos para se estudar os fenômenos após a derrota social. Muitas vezes, os resultados são pouco reproduzíveis, visto a complexidade do modelo e a ambiguidade nos comportamentos apresentados pelos animais. Koolhaas et al. (1999) resumem na idéia de *coping styles* essa ambiguidade nos comportamentos perante ao estresse observados nos animais: alguns animais possuem uma forma mais “ativa” e outros mais “passiva” de lidar com determinado estressor. É necessária a criação de um paradigma que seja mais simples e que apresente o mínimo de ambiguidade possível nos comportamentos.

1.4 Estudos funcionais dos sítios neurais envolvidos nas respostas de defesa na derrota social

Concomitante aos estudos etológicos, uma série de estudos funcionais têm mapeado os sítios neurais mobilizados durante o encontro social agonístico. Assim, em diversas espécies (como por exemplo, camundongo, hamster e rato), notou-se praticamente o mesmo padrão de mobilização dos sítios neurais nos intrusos imediatamente após o confronto com o dominante. Assim, nestes animais, aumentos

expressivos da expressão da proteína Fos foram descritos no giro do cíngulo, no núcleo septal lateral, setores do núcleo intersticial da estria terminal, bem como diversos setores amigdalares, hipotalâmicos e do tronco encefálico (KOLLACK-WALKER, WATSON, AKIL, 1997; KOLLACK-WALKER et al., 1999; MATSUDA et al., 1996; NIKULINA et al., 1998; MOTTA et al., 2009). Além disso, há mobilização dos núcleos medial e posterior da amígdala (KOLLACK-WALKER et al., 1999; MOTTA et al., 2009). No hipotálamo, o intruso apresenta uma ativação do núcleo paraventricular, bem como de elementos do circuito sexualmente dimórfico da zona medial, como por exemplo, a área pré-óptica medial, a parte ventrolateral do núcleo ventromedial, o núcleo tuberal e o núcleo pré-mamilar ventral (KOLLACK-WALKER, WATSON, AKIL, 1997; KOLLACK-WALKER et al., 1999; MOTTA et al., 2009; VEENING et al., 2005). Motta et al. (2009) reportaram que além dos elementos desse circuito, o intruso, em resposta ao ataque do co-específico, mobiliza o setor dorsomedial do núcleo pré-mamilar dorsal. Posteriormente, estes autores mostraram que a lesão seletiva deste sítio hipotalâmico praticamente abole as respostas de defesa passiva (*freezing* e posição *on-the-back*), enquanto mantém praticamente inalterada as respostas de defesa ativa. É importante ressaltar que a parte ventrolateral desse mesmo núcleo está envolvida nas respostas inatas e condicionadas de defesa ao predador (CANTERAS, 2002; CEZÁRIO et al., 2008), e que ele possui uma posição estratégica no hipotálamo, mandando projeções para o núcleo anterior do Tálamo e para a parte dorsal da Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) (CANTERAS; SWANSON, 1992; RISOLD; THOMPSON; SWANSON, 1997). A PAG dorsal já é conhecida pelo seu papel na expressão de comportamentos de defesa, tendo um papel crucial na execução deles (BANDLER; SHIPLEY, 1994; BEHEBEHANI, 1995).

1.5 Estudos funcionais dos sítios neurais envolvidos nas respostas de defesa ao contexto da derrota social

O conhecimento acerca da mediação neural das respostas de defesa quando o intruso é exposto ao contexto (ambiente) em que sofreu a derrota social é ainda muito fragmentado. Na realidade, os estudos funcionais relacionados à aquisição e expressão da memória da derrota social estão relacionados à “derrota condicionada”, que acaba sendo um fenômeno distinto da exposição ao ambiente

em que o intruso foi derrotado: a derrota condicionada trata-se de expressão de comportamentos de defesa a um co-específico não agressivo quando o intruso derrotado encontra-se em sua própria caixa moradia (POTEGAL et al, 1993; HUHMAN et al, 2003). Entretanto, por ser um fenômeno dependente da memória de uma derrota social, esses trabalhos podem guiar os estudos funcionais acerca da expressão dos comportamentos de defesa expressos ao contexto em que o intruso sofreu a derrota, que nunca foram feitos.

Markham e Huhman (2008) levantaram a hipótese de que o núcleo medial da amígdala pudesse ter um papel importante tanto na aquisição quanto na expressão da “derrota condicionada”, entretanto, eles mostraram que na verdade tal núcleo parece ser importante apenas como percepção de pistas feromonais (MARKHAM; HUHMAN, 2008). Em contraste, o núcleo basolateral parece ter um papel crítico para a consolidação mnemônica no processo de “derrota condicionada” (JASNOW et al., 2005; MARKHAM; HUHMAN, 2008; MARKHAM; TAYLOR; HUHMAN, 2012), enquanto que o núcleo intersticial da estria terminal (BST) possui papel importante na expressão do fenômeno (JASNOW; DAVIS; HUHMAN, 2004; MARKHAM; NORVELLE; HUHMAN, 2009). Assim, foi mostrado que a administração de muscimol (MARKHAM; NORVELLE; HUHMAN, 2009) no BST, compromete a expressão dos comportamentos de defesa, mas não influencia na aquisição de memória referente aos eventos aversivos com o co-específico. De fato, estes estudos mostram papel importante da amígdala e do BST nos comportamentos observados após derrota social. A participação destas estruturas (BST e núcleo basolateral da amígdala) já são conhecidas pelo seu papel em respostas de defesa condicionada em outros contextos não etológicos (LEDOUX, 2000). Estudos mais recentes desse mesmo grupo de pesquisa mostraram que o septo lateral (LS) é fundamental na expressão dos comportamentos de defesa e na diminuição dos comportamentos agressivos, visto que a ativação de receptores gabaérgicos com muscimol antes da exposição ao co-específico não agressivo abolem a expressão dos comportamentos de defesa e restituem os comportamentos agressivos dos animais previamente derrotados (MCDONALD et al, 2012). O septo lateral recebe projeções do hipocampo ventral (RISOLD; SWANSON, 1997), o qual tem sido implicado na aquisição da “derrota condicionada”, pois sua inativação antes da derrota abole os comportamentos de defesa da “derrota condicionada” (MARKHAM; TAYLOR; HUHMAN, 2012).

Novamente, deve-se salientar que a “derrota condicionada” não se trata de expor o animal ao contexto da derrota: neste caso, o intruso deveria ser exposto somente ao ambiente em que sofreu a derrota prévia, e não a outro co-específico não agressivo, que por si só pode induzir outras respostas comportamentais.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho visou estudar as bases neurais dos comportamentos de defesa na exposição ao contexto da derrota social, para tanto, estabelecemos dois objetivos:

- a)** elaborar um paradigma para estudo dos comportamentos de defesa na exposição ao contexto de uma derrota, para avaliarmos de forma fidedigna os comportamentos de defesa condicionada apresentados pelo animal após uma única derrota sócia, tomando como base, o paradigma residente-intruso;
- b)** realizar um mapeamento neural dos sítios mobilizados na situação contextual da derrota social, utilizando como ferramenta a detecção imunohistoquímica para proteína Fos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sujeitos

Ratos Long-Evans e Wistar, provenientes do Departamento de Anatomia do ICB-USP, com 3 meses de idade (por volta de 300 g), mantidos em condições de temperatura (por volta de 23 °C) e ciclo claro/escuro controlados (12 horas), com livre acesso à água e ração. Todos foram mantidos no biotério de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 Aparato Experimental

O aparato experimental consiste de duas caixas (25X25X25 cm) em que residiram os ratos Wistar (Caixa Moradia) e os ratos Long Evans (Caixa do Residente) e um corredor (100 cm de comprimento por 12,5 cm de largura e 25 cm de altura) ligando a caixa moradia com a caixa do residente (Figura1).

Figura 1 - Desenho esquemático do aparato utilizado nos experimentos.

FONTE: Rangel Jr (2012).

3.3 Desenho Experimental e Paradigma Residente/Intruso

O procedimento com os ratos Wistar (intrusos) consistia de 3 fases: Habituação, Derrota e Contexto (Figura 2):

- a) *Habituação*: nessa fase, eles andaram livremente da Caixa Moradia, até a Caixa do Residente que está sem o residente, contendo maravalha limpa e ração, durante 10 minutos, por 10 dias consecutivos.
- b) *Derrota*: no décimo dia, o intruso entra na caixa do residente, que contém um macho Long Evans, previamente mantido nesta caixa por um período de três semanas com uma fêmea Long Evans laqueada, a qual foi retirada imediatamente antes do teste. Assim que o intruso entra na caixa do residente, a porta foi fechada e houve um encontro agonístico entre os dois animais, que durou 10 minutos. Durante o embate o intruso apresenta comportamentos de defesa típicos. Após este período, a porta da Caixa do Residente foi aberta, permitindo que o intruso voltasse para sua Caixa Moradia. O rato residente já possuía experiência em brigas, com aproximadamente o dobro do peso do intruso (cerca de 600 g).
- c) *Contexto*: vinte quatro horas após o confronto, os ratos intrusos foram expostos por 5 minutos ao ambiente onde foram derrotados (Caixa do Residente e Corredor que liga à Caixa do Residente). Na Caixa do Residente mantivemos apenas a maravalha com o cheiro do residente.

Houveram dois grupos controles:

- a) *Controle de Cheiro*: em que os intrusos foram apenas expostos à maravalha com o cheiro do residente, tanto na fase “Derrota” quanto na fase “Contexto”.
- b) *Controle Branco*: em que os intrusos foram apenas expostos à caixa com maravalha limpa (ambiente), sem cheiro de outro co-específico, tanto na fase “Derrota” quanto na fase “Contexto”.

Noventa minutos após a exposição ao contexto, os animais foram sacrificados, perfundidos e seus encéfalos foram retirados para posterior análise de imunohistoquímica para proteína Fos.

Figura 2 - Desenho experimental.

	1ª Fase	2ª Fase	3ª Fase
Grupo Contexto:	Habituação	Derrotas	Contexto
Grupo Branco:	Habituação	Exp. Ambiente	Exp. Ambiente
Grupo Cheiro:	Habituação	Exp. Cheiro	Exp. Cheiro

FONTE: Rangel Jr (2012).

3.4 Laqueadura

As fêmeas da linhagem Long Evans foram laqueadas com três meses de vida. Para a realização deste procedimento os animais foram anestesiados com o anestésico Rompum (0,2 ml/100 g). Uma incisão lateral permitiu que, com um fio de sutura, o ovário fosse separado do útero, cortando e retirando parte dos dois cornos do útero. Este procedimento foi realizado no ovário esquerdo e direito. Após a recuperação da cirurgia o animal foi tratado por três dias com Paracetamol v.o. (4 mg/100 ml) que foi diluído na água e foi oferecido *ad libitum*.

3.5 Análise comportamental

Os experimentos foram filmados e os dados analisados posteriormente por um observador treinado utilizando o software de análise etológica *The Observer* (Noldus).

A análise dos comportamentos durante as derrotas foi feita de forma qualitativa: foram analisados quatro classes de comportamento, no momento do confronto, baseados em Potegal et al. (1993):

- a) Não-social: comportamentos relacionados a exploração do ambiente (locomotion/exploratory), auto-limpeza (grooming), feeding (alimentar-se), up-right position (detalhes adiante).
- b) Social: Investigação ano-genital (animal cheira região genital do outro).
- c) Defesa:
 - a. *Freezing*: congelamento,
 - b. *On-the-back*: animal permanece com o ventre para cima

- c. *Upright position*: animal apoia-se sobre as patas posteriores, mantendo as anteriores livres, realizando movimentos aparentemente reflexos de proteção da face frente aos ataques do co-específico agressivo.
- d. *Sideway defense*: o animal se mantém posicionado de lado em relação ao macho agressor, tentando proteger a face desviando ela do co-específico.
- e. *Flight*: o animal corre pelo aparato, tentando evitar um confronto direto com o outro macho. Ele pode eventualmente realizar saltos.
- f. *Avaliação de risco*: crouch-sniff, stretch attend, stretch posture (detalhes adiante).

d) Ataques sofridos pelos intrusos.

Por não haver manipulação nos intrusos que foram derrotados e os outros dois grupos constituírem-se de animais que não foram expostos a um residente agressivo, os comportamentos dos intrusos não foram quantificados, já que uma análise qualitativa já foi o suficiente para a conclusão de que os intrusos foram inequivocamente derrotados e de que os grupos controle não passaram por nenhum tipo de estresse social.

Na exposição ao contexto, foram observados os comportamentos baseados em Ribeiro-Barbosa et al. (2005):

- a) *Locomoção/Exploração*: o animal anda com dorso arqueado e sem hesitação, cheirando todo o ambiente.
- b) *Grooming*: comportamento de auto-limpeza. O animal realiza movimentos com as patas anteriores e focinho, lambendo o corpo.
- c) *Up-right position*: exploração do ambiente, entretanto, o animal a realiza com o corpo apoiado pelas patas posteriores e as patas anteriores apoiada nas paredes do aparato.
- d) *Rearing*: exploração vertical do ambiente. O animal se apoia sobre as patas posteriores, mas as patas anteriores não estão apoiadas. Ele realiza movimentos da cabeça mexendo o focinho e as vibrissas.
- e) *Flight*: movimento brusco de recuo quando em determinado ambiente, podendo correr de volta a caixa moradia.

- f) *Freezing*: reação de imobilidade. Animal mantém-se imóvel, com respiração explosiva e mantendo considerável tensão nos músculos dos membros.
- g) *Crouch-sniff*: comportamento de avaliação de risco em que o animal mantém-se apoiado pelas patas posteriores e realiza um scanning do ambiente, mexendo a cabeça e a parte superior do tronco de forma bem lenta.
- h) *Stretch attend*: comportamento de avaliação de risco em que o animal está com as quatro patas apoiadas no chão, entretanto, as patas posteriores estão imóveis. O animal realiza movimentos lentos de scanning esticando a parte anterior do tronco.
- i) *Stretch approach*: muito semelhante ao stretch attend, entretanto, o animal se movimento pelo aparato, ainda que de forma lenta e hesitante. É notável como a parte anterior do tronco sempre se mantém esticada.

Para os propósitos do trabalho realizado, os comportamentos Locomoção/Exploração e Up right Position, apesar de analisados separadamente, na apresentação de resultados, foram considerados como em uma única categoria: Locomoção/Exploração. Os comportamentos de Crouch-sniff, Stretch attend e Stretch approach, visto caracterizarem uma exploração cautelosa (avaliação de risco), na apresentação de resultados, foram unidos em uma mesma categoria: Avaliação de Risco. Tal forma de apresentação visou facilitar a exposição dos resultados, comparando dois parâmetros importantes na identificação da defesa condicionada no ambiente em que o intruso sofreu a derrota: a diminuição de comportamentos exploratórios desinibidos e aumento de comportamentos de avaliação de risco.

Foram obtidas também medidas espaço-temporais: duração do tempo de permanência em cada compartimento do aparato (Caixa Moradia, Corredor e Caixa do Residente) dos três grupos (Contexto, Branco e Cheiro).

3.6 Imunohistoquímica para Fos

Noventa minutos após o término da observação comportamental na exposição ao contexto da pós-derrota os animais foram anestesiados com sódio pentobarbital (40mg/kg, i.p.) e perfundidos por via transcardíaca com uma solução

de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M com pH de 7,4. Após a perfusão, os encéfalos foram retirados do crânio e colocados em solução de sacarose 20% feita em tampão fosfato 0,1M na temperatura de 4°C por um período de aproximadamente 12 horas. Os encéfalos foram posteriormente congelados e 5 séries de cortes frontais com 40µm de espessura foram cortadas utilizando um micrótomo no plano frontal/transverso. Uma série de cortes foi processado para imunohistoquímica com anticorpo anti-Fos de coelho (Ab-5, Calbiochem, San Diego, CA, USA) utilizando a diluição de 1:40.000. O anticorpo primário foi localizado com uma variação do complexo avidina-biotina. Os cortes foram incubados por 90 minutos em temperatura ambiente numa solução de “goat anti-rabbit IgG” biotilada (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), e então colocada numa solução mista de avidina-biotina horseradish peroxidase (HRP) (ABC Elite; Vector Laboratories) pelo mesmo período de tempo. O complexo peroxidase foi visualizado pelo mesmo período de tempo. O complexo peroxidase foi visualizado pela exposição por cerca de 10 minutos numa solução cromógena contendo 0,02% de 3,30 diaminobenzidina tetraidrocloride (DAB, Sigma, St Louis, MO, USA) com 0,3% de sulfato de níquel-amônia em tampão Tris a 0,05M (pH 7,6), seguido de incubação por 10 minutos em solução cromógena com hidrogênio peroxidase (1:3000) para resultar num produto azul escuro. A reação foi interrompida por lavagens em tampão salina Potássio Fosfato (KPBS; pH 7,4). Os cortes foram colocados em lâminas gelatinadas e posteriormente desidratados e cobertos com DPX (Sigma). Uma série de cortes adjacentes foi corado com tionina pelo método de Nissl para servir como referência citoarquitetônica.

3.7 Quantificação de células marcadas com Fos

A medida da densidade de neurônios imunoreativos para Fos foi quantificado por um observador que desconheça a distribuição dos animais entre os grupos experimentais. A quantificação foi feita utilizando-se a objetiva de 10X do microscópio Nikon Eclipse 80i (Nikon Corporation, Chiyoda-Ku, Tokyo-To, Japan) equipado com uma câmera digital Nikon DXM1200F (Nikon Corporation). Para a marcação de Fos, foi feita primeiramente a marcação de bordas da região de interesse, que foram definidas em cortes de tecido adjacentes corados com Nissl. Apenas núcleos com nítidas bordas ovais localizados dentro dos limites da região de

interesse foram quantificados. A densidade de células marcadas com Fos foi determinada dividindo o número de células imunorreativas para Fos pela área da região de interesse. Ambos, contagem de células e o dimensionamento da área foram feitos com uso do programa Image-Pro Plus (version 4.5.1; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

A contagem de células no PMD dorsomedial e ventrolateral foi feita utilizando-se uma objetiva de 10X do microscópio Nikon Eclipse E600 equipado com uma câmera lúcida. A delimitação das bordas do núcleo foi feita utilizando-se os cortes adjacentes corados com Nissl em que aparecia o PMD. A contagem foi feita manualmente, dando um número absoluto do número de células observadas nos limites do núcleo delimitado.

A determinação dos núcleos estudados foi feita de acordo com o Atlas de Neuroanatomia “The Brain Maps: structure of the rat brain (SWANSON, 2004).” A delimitação das áreas da Substância Cinzenta Periaquedutal foi feita de acordo com o trabalho de Comoli et al. (2003).

3.8 Análise Estatística

Foi aplicada uma análise de variância paramétrica (ANOVA) para cada grupo de dados coletados, com nível de significância definido como 1% ($p \leq 0,01$). No caso das medidas de densidade de células marcadas com Fos, o valor de p foi corrigido utilizando a correção de Bonferroni, em que o alfa corrigido é o alfa global (5%) dividido pelo número de análises que foram feitas. Nas comparações em que se verificou significância na ANOVA, foi feito uma análise post-hoc, utilizando o teste de Tukey.

4 RESULTADOS

4.1 Dados comportamentais

Os dados comportamentais mostraram que os intrusos foram efetivamente derrotados pelos residentes, apresentando comportamentos de defesa. Ao entrar na caixa do residente, os intrusos realizaram alguns comportamentos exploratórios, principalmente os anteriormente descritos como *exploratory/locomotion* e o *up right position*. Neste momento todos foram atacados pelo residente e num primeiro momento, apresentaram tentativas de fuga, com saltos e corridas pelo aparato. Também foram observados o *up right defense* e *sideway defense*. Na sequência foram imobilizados pelo oponente, permanecendo uma boa parte do tempo congelados (*freezing*) na posição *on the back*. Notável a completa ausência de comportamentos agressivos por parte dos intrusos.

Durante a exposição ao contexto, os animais mostraram-se muito hesitantes para entrar na Caixa do Residente, mantendo-se parte do tempo no Corredor, realizando os comportamentos de avaliação de risco: *stretch attend*, *stretch approach* e o *crouch sniff*. Também foram observados comportamentos descritos como fuga (*flight*): os animais, após realizarem os comportamentos de avaliação de risco, voltavam rapidamente para a Caixa Moradia, mantendo-se nesse compartimento por um tempo considerável. Praticamente toda movimentação observada pelos intrusos derrotados foi do tipo avaliação de risco, com pouco tempo gasto em comportamentos exploratórios (*up right position* e *exploratory/locomotion*) e de auto-limpeza (*grooming*).

4.1.1. Medidas Espaço-temporais (Figura 3)

A ANOVA mostrou que há uma diminuição significativa no tempo gasto pelos animais derrotados dentro da Caixa do Residente ($p=0,000002$). O tempo gasto dentro da Caixa Moradia e no Corredor não difere com os dois controles ($p=0,0367$, para a Caixa Moradia, $p=0,1332$). O pos-hoc de Tukey mostrou que os animais derrotados ficam significativamente menos tempo na Caixa do Residente quando comparados

tanto ao controle de Cheiro quanto ao controle Branco ($p < 0,0002$), e esses dois controles não diferem entre si ($p = 0,092$).

Figura 3 - Tempo gasto em cada um dos compartimentos do aparato do experimento no grupo Contexto (derrotado) e nos controle de Cheiro e Branco, quando na fase de “Contexto”.

Dados expressos em média+erro padrão. * diferença estatisticamente significativa em relação aos dois grupos controle ($p \leq 0,01$).

FONTE: Rangel Jr (2012).

4.1.2. Medidas Comportamentais (Figura 4)

Os animais derrotados apresentaram significativamente mais comportamentos de avaliação de risco ($p = 5,78 \cdot 10^{-12}$) e *flight* ($p = 0,00001$) que os animais controle. A análise post-hoc de Tukey nesses parâmetros que o grupo Contexto difere dos dois grupos controle, que não diferem entre si (avaliação de risco: $p = 0,0001$ e $p = 0,0001$ quando Contexto é comparado com controles de Cheiro e Branco respectivamente, e $p = 0,943$ quando os dois controles são comparados entre si; *flight*: $p = 0,0001$ e $p = 0,0001$ quando Contexto é comparado com controles de Cheiro e Branco respectivamente, e $p = 1$ quando os dois controles são comparados entre si). Para o *freezing*, a ANOVA não mostrou uma diferença significativa ($p = 0,0665$). Os animais dos dois grupos controle também apresentaram significativamente mais comportamentos de exploração que os animais derrotados ($p = 0,000001$). O post-hoc de Tukey mostra que os animais do grupo Contexto

realizaram menos comportamentos exploratórios desinibidos que os dois grupos controle, que não diferem quando comparados entre si ($p=0,0001$ e $p=0,0001$ quando Contexto é comparado com os controle de Cheiro e Branco respectivamente e $p=0,805$ quando os dois controles são comparados entre si). O restante dos itens comportamentais não apresentaram diferença significativa.

Figura 4 - Comportamentos observados no grupo Contexto (derrotado) e nos controles de Cheiro e Branco, quando na fase de “Contexto”.

Dados expressos em média+erro padrão. * diferença estatisticamente significativa em relação aos dois grupos controle ($p \leq 0,01$).

FONTE: Rangel Jr (2012).

4.2 Medidas de Densidade de células imunorreativas à proteína Fos (Tabela 1, Figuras 5 e 6)

As medidas de densidade foram realizadas em cinco regiões do encéfalo do rato: hipotálamo, septo lateral, núcleo intertiscial da estria terminal (BST), amígdala e substância cinzenta periaquedutal (PAG), totalizando 47 sítios neurais. Por ser um número elevado de comparações feitas simultaneamente, utilizou-se a correção de Bonferroni para ajustar o valor de alfa ($p \leq 0,001$).

Observou-se, por meio dessa medida, um aumento na expressão de proteína Fos nos animais derrotados e expostos ao contexto em elementos do circuito sexualmente dimórfico no hipotálamo medial e estruturas relacionadas a identificação de pistas feromonais e contextuais.

4.2.1 Densidade de células imunorreativas à proteína Fos no Hipotálamo

No hipotálamo, observou-se um aumento de expressão de proteína Fos nos seguintes núcleos: na parte magnocelular do núcleo paraventricular (PVHm) ($p=0,0001$), na parte ventrolateral do núcleo ventromedial (VMHvl) ($p=0,0012$), na área hipotalâmica tuberal (LHA_{tu}) ($p=0,0007$), no núcleo pré-mamilar dorsal (PMD) ($p=0,0003$). As análises post-hoc mostraram que no caso do PVHm, o grupo Contexto é apenas diferente se comparado ao controle Branco, e os dois controles são diferentes entre si ($p=0,06$ e $p=0,0002$ quando Contexto é comparado com controle de Cheiro e Branco respectivamente, e $p=0,0165$ quando os dois controles são comparados entre si); no VMHvl a expressão de proteína Fos é maior nos animais derrotados tanto em relação aos animais expostos apenas ao cheiro quanto aqueles expostos somente ao ambiente, e os dois controles não diferem entre si ($p=0,003$ e $p=0,003$ quando Contexto é comparado ao controle de Cheiro e Branco respectivamente e $p=0,995$ na comparação entre os dois controles), no LHA_{tu} também possui uma maior expressão de proteína Fos nos animais expostos ao contexto, tanto em relação ao controle de Cheiro quanto ao controle Branco ($p=0,016$ e $p=0,0008$ quando Contexto é comparado aos controle de Cheiro e Branco respectivamente e $p=0,266$ quando os dois controles são comparados entre si), e por fim o PMD também possui uma maior expressão de proteína Fos nos animais derrotados expostos ao contexto em relação tanto ao controle de Cheiro quanto ao controle Branco e os dois controles não diferem entre si ($p=0,0029$ e $p=0,0006$ quando Contexto é comparado com controle de Cheiro e Branco respectivamente e $p=0,631$ quando os dois controles são comparados entre si). Destacamos ainda uma clara tendência ao aumento da expressão da proteína Fos no núcleo pré-óptico medial (MPN, $p=0,007$), área hipotalâmica lateral juxtadorsomedial (LHA_{jd}, $p=0,01$) e no núcleo pré-mamilar ventral (PMV, $p=0,004$), que só não atingiram significância estatística devido o ajuste do valor de p pela correção de Bonferroni ($p \leq 0,001$).

4.2.2 Densidade de células imunorreativas à proteína Fos na Amígdala

Nenhum núcleo da amígdala apresentou significância estatística na ANOVA com um $p \leq 0,001$, entretanto, com um $p \leq 0,01$, os seguintes núcleos apresentaram um aumento de expressão da proteína Fos nos animais derrotados e expostos ao contexto da derrota: parte posterodorsal do núcleo medial (MEApd) ($p=0,009$) e a parte anterior do núcleo basolateral (BLAa) ($p=0,005$). A análise post-hoc mostrou que o MEApd possui mais expressão de Fos no grupo Contexto tanto em relação ao controle de Cheiro quanto ao controle Branco ($p=0,03$ e $p=0,01$ quando Contexto é comparado com controle de Cheiro e Branco respectivamente e $p=0,87$ quando os dois controles são comparados entre si) e tal resultado também vale para o BLAa ($p=0,01$ e $p=0,008$ quando Contexto é comparado com controle de Cheiro e Branco respectivamente e $p=0,85$ quando os dois controles são comparados entre si).

4.2.3 Densidade de células imunorreativas à proteína Fos no BST

A ANOVA não mostrou nenhum efeito na expressão de células imunorreativas à proteína Fos no BST com um $p \leq 0,001$. Com um $p \leq 0,01$ apenas a parte anterodorsal do BST apresentou um aumento significativo na expressão de proteína Fos nos animais derrotados e expostos ao contexto, sendo que o post-hoc de Tukey mostrou que esse aumento é apenas significativo quando o grupo Contexto é comparado ao controle Branco ($p=0,009$). Entretanto, os dois controles, quando comparados, não diferem entre si ($p=0,094$).

4.2.4 Densidade de células imunorreativas à proteína Fos no Septo Lateral

A ANOVA mostrou um aumento significativo na expressão de proteína Fos apenas nas células do septo lateral rostral (LSr, $p=0,00000003$), e o teste post-hoc de Tukey mostrou que esse aumento é significativo tanto em comparação com o controle de Cheiro ($p=0,0001$) quanto o controle Branco ($p=0,0001$). Os dois controles não diferem entre si ($p=0,9$).

4.2.5 Densidade de células imunorreativas à proteína Fos na Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG)

Em nenhuma das regiões da PAG analisadas foi verificado algum efeito na expressão de células imunorreativas à proteína Fos pela ANOVA.

Tabela 1 – Densidade de células imunorreativas para proteína Fos no Hipotálamo, Amígdala, BST, Septo Lateral e PAG em animais derrotados expostos ao contexto, e animais não derrotados expostos ao cheiro (controle de Cheiro) de um co-específico e ao ambiente sem cheiro de um co-específico (controle Branco).

Região/Núcleo	Nível	Contexto	Cheiro	Branco
<u>Hipotálamo</u>				
MPN*	20	355,7±41,7 [#]	301,5±54,8	132±25,8
SQH	22	3817,3±451,6	3692,9±268	3049,3±225,6
AHNr	24	350±41,5	286±37,2	321,4±24,7
AHNi	25	287,5±30,8	236,1±21,1	258,5±25,4
AHNc	26	280,2±23,3	226,7±56	171,1±15,8
PVHpm	26	925,8±112,7	529,4±150,9	413,4±105,1
PVHm**	26	731,4±130 [#]	438±50	56,3±17,4
PVHpl	27	416,3±84,3	364±42	335,7±74
VMHdm	29	40,9±10,2	46,5±11,7	44,1±10,4
VMHvl**	29	276,2±45,5 ^{+,#}	86,1±30	81,3±21,8
DMHa	29	487,2±51	374,7±35,4	308,5±41
LHA _{tu} **	29	232,7±32 ^{+,#}	138,4±12	87,7±13,1
LHA _{jd} *	29	461,7±52 ^{+,#}	286,1±42	289,2±32,2
LHAd	29	138,2±20,6	121,7±27,6	100,6±12,4
PMV*	32	540±158,5 ^{+,#}	97,1±20,3	73,5±13,7
PH	32	294,2±35,1	244,6±24,6	193,7±50
PMD**	33	728,2±93,2 ^{+,#}	262,8±101,3	149±33
SUMm	35	479±65	562,9±122,1	400,2±27,4
MM	35	27,9±8	28,7±6,4	19,7±4,5
LM	35	38,3±11,2	20,5±7,5	41,6±8,9
<u>Amígdala</u>				
MEAad	27	243,2±64,8	117±25,7	83,2±34,3
MEApv	29	189±60	116,9±35,3	47,5±14,3
MEApd*	29	252,3±73,2 ^{+,#}	72,3±16,8	39,4±13,3
CEAI	27	184,1±35	148±14,3	113,1±25,1
CEAm	27	77±19	69,3±11,1	67,5±9,1
BLAa*	27	232,4±46,3 ^{+,#}	107,7±12,6	84,3±11,2
BLAp	30	83,1±24,7	66,6±12,5	67±15,8

Tabela 1 – Densidade de células imunorreativas para proteína Fos no Hipotálamo, Amígdala, BST, Septo Lateral e PAG em animais derrotados expostos ao contexto, e animais não derrotados expostos ao cheiro (controle de Cheiro) de um co-específico e ao ambiente sem cheiro de um co-específico (controle Branco).

Região/Núcleo	Nível	Contexto	Cheiro	Branco
<u>Amígdala</u>				
BMAa	27	69,7±10,2	45,3±4,6	67,6±19,3
BMAp	30	73±9,5	99,1±14,9	61,6±17,7
LA	30	100±18,2	59,8±7,5	56±18,7
PA	32	192,3±34,7	109±35,2	55,4±21,1
COAa	27	215,7±38,2	142,5±23,6	79,3±22,8
<u>BST</u>				
BSTad*	19	284,6±32,7 [#]	231,9±34,7	131,4±22,9
BSTav	21	235,4±25,4	214±44	238±36,8
BSTpr	22	95,7±11,2	74,9±18,3	62,5±20
BSTtr	22	120,3±20,6	76,6±14,6	82,5±21,5
BSTif	22	157,6±29,3	142,7±24,2	75,4±15,6
<u>Septo Lateral</u>				
LSr**	15	484,9±55,2 ^{+,#}	99±20,8	76,2±9,1
LSc	18	115±16,2	106,3±12,9	77,7±16,6
LSv	19	445,4±63,9	297,1±67,3	284,3±53,7
<u>PAG</u>				
PAGrdm	40	250,5±38,3	165,6±35,3	154,1±32,3
PAGrdl	40	267,5±59,1	177,9±49,6	175±42,5
PAGrl	40	212,8±29,4	160±26	107,3±26,7
PAGcdm	45	169,6±36,3	81,3±21,4	107,8±39,1
PAGcdl	45	184,1±33,1	130,3±17,5	137,1±22
PAGcl	45	115,8±19,4	115,8±16	121±19,3
PAGcvi	45	155,8±24,3	106,3±13,4	117,4±23,6

Número de células/mm². A coluna “Nível” se refere aos números das pranchas do *Brain Maps* (SWANSON, 2004), indicando os níveis rostrocaudais aproximados em que as medidas foram feitas. Dados expressos em média±erro padrão. ** ANOVA com p≤0,001. * ANOVA com p≤0,01. + p≤0,05 comparada ao grupo controle de Cheiro. # p≤0,05 comparada ao grupo ao grupo controle Branco.

FONTE: Rangel Jr (2012).

Figura 5 - Fotomicrografia de corte transversal de seções reagidas para proteína Fos nos níveis do núcleo septal rostral (A, D, G), núcleo medial da amígdala (B, E, H) e núcleo préoptico medial (C, F, I) nos animais derrotados expostos ao Contexto e nos dois grupos controle (Cheiro e Branco).

Exposição ao Contexto: A, B, C. Controle de Cheiro: D, E, F. Controle Branco: G, H, I.
 FONTE: Rangel Jr (2012).

Figura 6 - Fotomicrografia de corte transversal de seções reagidas para proteína Fos nos níveis do núcleo ventromedial do hipotálamo (A, D, G), núcleo pré-mamilar ventral (B, E, H) e núcleo pré-mamilar dorsal (C, F, I) nos animais derrotados expostos ao Contexto e nos dois grupos controle (Cheiro e Branco).

Exposição ao Contexto: A, B, C. Controle de Cheiro: D, E, F. Controle Branco: G, H, I.
 FONTE: Rangel Jr (2012).

4.3 Contagem de células imunorreativas para proteína Fos no núcleo pré-mamilar dorsal (PMD) (Figura 7)

A ANOVA mostrou diferenças entre os grupos nas contagens de célula imunorreativas para proteína Fos do PMD, tanto para o núcleo inteiro ($p=0,005$), como para a parte dorsomedial (dm, $p=0,006$) e ventrolateral do núcleo (vl, $p=0,01$). O teste post-hoc de Tukey mostrou que o grupo Contexto difere dos controles de Cheiro e Branco tanto para as contagens do PMD inteiro ($p=0,01$ e $p=0,01$ quando Contexto é comparado com o controle de Cheiro e Branco respectivamente, e $p=0,99$ quando os dois controles são comparados entre si) quando para sua parte dorsomedial ($p=0,01$ e $p=0,01$ quando Contexto é comparado com controle de Cheiro e Branco respectivamente e $p=0,92$ quando os dois controles são comparados entre si). Entretanto, referente à parte ventrolateral, o grupo Contexto é apenas diferente se comparado ao controle de Cheiro ($p=0,009$) e não ao controle Branco ($p=0,11$), todavia os dois controles não diferem entre si ($p=0,52$).

Figura 7 - Resultado da contagem de células imunorreativas para proteína Fos no núcleo pré-mamilar dorsal (PMD).

Dados expressos em média+erro padrão. * diferença estatisticamente significativa em relação aos dois grupo controle ($p < 0,01$).

FONTE: Rangel Jr (2012).

5 DISCUSSÃO

5.1 Dados comportamentais

Os dados comportamentais e espaço-temporais mostraram que o animal que é previamente derrotado por um co-específico agressivo irá apresentar comportamentos de defesa quanto exposto ao ambiente em que ocorreu a experiência aversiva, além de evitarem ativamente o local em que eles sofreram a derrota social. Isso mostra que o animal é capaz de reter uma memória contextual. O controle de Cheiro, utilizando o cheiro de outro animal, mostra que o cheiro de um co-específico por si só não é capaz de eliciar comportamentos de defesa. Para o controle Branco, notamos que o animal exposto apenas ao ambiente, sem o cheiro do co-específico, também não apresenta comportamentos de defesa.

O que é notável no paradigma aqui usado é a estabilidade dos padrões comportamentais apresentados se comparado com o que se conhece a cerca da derrota social. Koolhaas et al. (1999) discutem essa variabilidade, falando em estilos individuais de cada animal lidar com determinado estresse. Alguns animais são mais “ativos” e outros mais “passivos”. Experimentos pilotos mostraram que essa variabilidade dificultava muito a análise do comportamento, sempre apresentando resultados inconclusivos, já que havia uma grande dificuldade entre diferenciar os comportamentos de avaliação de risco de comportamentos exploratórios típicos de roedores quando colocado em um ambiente novo. Também ficava difícil afirmar se os comportamentos de defesa apresentados durante o contexto e o encontro agonístico eram devido ao estresse social ou à exposição de um ambiente novo.

Tais problemas devem ter sido causados pelo próprio procedimento experimental utilizado anteriormente: os intrusos eram deliberadamente manipulados pelo experimentador, sendo colocados na caixa do residente, sem uma sessão de habituação. A observação do animal em uma única caixa, com dimensões relativamente reduzidas (ver Figura 8), não permite identificar o “conflito de interesses” que ocorre quando os roedores se encontram em um “estado ansioso” (para revisão, ver BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003; BLANCHARD et al., 1995). O único comportamento de defesa possível de identificar e quantificar quando o animal é observado numa caixa única, com dimensões relativamente

reduzidas, é o *freezing* (postura mais “passiva”, já que não há possibilidade de ele fugir ou evitar o local). Como pudemos observar, temos muito pouco *freezing* na exposição ao contexto da derrota social. Sendo que o mesmo acontece quando o animal é exposto ao contexto relacionado à exposição predatória (CEZÁRIO et al., 2008; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005).

Figura 8 - Aparato utilizado para os experimentos pilotos. Note ser apenas uma caixa plexiglas comum.

FONTE: Rangel Jr (2012).

Baseando-se no Visible Burrow System (BLANCHARD et al., 1995) e no paradigma experimental usado no próprio laboratório para se estudar comportamentos de defesa em resposta ao predador (CEZÁRIO et al., 2008; RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005), montou-se um modelo no qual é possível identificar com clareza os comportamentos exploratórios e os comportamentos de avaliação de risco. Ao colocar duas caixas (Caixa Moradia e Caixa do Residente) e um corredor conectando-as, foi possível ao animal previamente derrotado a escolha de não entrar na caixa do residente. De fato, como evidenciado pelas medidas espaço-temporais, os intrusos derrotados evitam entrar na caixa do residente, passando menos tempo dentro dela do que os outros dois grupos controle. O corredor representa um ambiente neutro, onde ele fará a escolha. A presença do corredor de acesso à Caixa do Residente permitiu revelar o conflito que o animal apresenta, expressando comportamentos de avaliação de risco, tais como o *crouch sniff* (seria um estágio em que o animal se mostra pronto para congelar, entretanto,

ainda atento ao ambiente, fazendo movimentos lentos com a cabeça e parte superior do corpo, realizando um *scanning* visual e cheirando o ambiente) e o *stretch attend* e o *stretch approach* (quando o intruso estica o corpo explorando cautelosamente o ambiente).

É importante ressaltar que durante o encontro agonístico, os intrusos apresentaram pouca variabilidade nos comportamentos de defesa. Todos apresentaram uma parcela significativa de *freezing* e *crouch-sniff*, tal como tentativa de fuga (*flight*) foi presente em todos os animais. Notável que tanto nos experimentos piloto quanto no paradigma aqui proposto, não houve nenhum comportamento agressivo por parte dos intrusos.

Outro procedimento bastante útil para a estabilização dos comportamentos de defesa nos ratos foi a habituação. Em estudos com exposição predatória, foi mostrado que a habituação exaustiva ao ambiente onde ocorrerá o teste comportamental é crítica para a estabilização das respostas de defesa, tanto inatas como contextuais (RIBEIRO-BARBOSA et al., 2005). Foi observado que nos primeiros dias de exposição ao aparato, os animais apresentam comportamentos de avaliação de risco. Após o longo período de habituação, os animais chegam ao décimo dia sem apresentarem qualquer comportamento de avaliação de risco durante a exploração do aparato. Dessa forma, é possível afirmar que os comportamentos de defesa apresentados durante o encontro agonístico e durante a exposição ao contexto são devidos à experiência aversiva com o residente, e não a uma provável exposição a um ambiente desconhecido pelo intruso. Vale lembrar que na grande maioria dos modelos usados para se estudar derrota social não são feitos uma habituação tão exaustiva às condições de experimentação.

Esse paradigma permite o estudo da memória contextual relacionada à derrota social, visto não utilizar estímulos discriminativos. Ele também tem a vantagem de ser um paradigma no qual a manipulação direta do experimentador é bastante reduzida.

5.2 Dados de células imunorreativas à proteína Fos

A análise de densidade de células imunorreativas para Fos revela que durante a expressão dos comportamentos de defesa na exposição ao contexto da derrota social são mobilizados os mesmos sítios ativos durante o encontro

agonístico (KOLLACK-WALKER; WATSON; AKIL, 1997; KOLLACK-WALKER et al., 1999; MATSUDA et al., 1996; MARTINEZ; PHILIPS; HERBERT, 1998; MOTTA et al., 2009, VEENING et al., 2005). Devido ao elevado número de comparações, adotamos a correção de Bonferroni, com um alfa de 0,1%, o que certamente limita o número de estruturas com aumento estatisticamente significativo na expressão da proteína Fos. O uso da correção de Bonferroni no presente estudo foi feito para evitarmos “falsos positivos”, visto o número elevado de comparações feitas simultaneamente. Todavia, para a presente análise, também chamamos a atenção para os sítios que na comparação estatística apresentaram alfa de menor ou igual à 1%. Assim, com um alfa de 1% foi possível ampliarmos o leque de estruturas (com nítida tendência de aumento da expressão da proteína Fos) possivelmente relacionadas a expressão do comportamento de defesa durante a exposição ao contexto da derrota social. Vale ressaltar também, que a ausência de expressão de Fos ou, a ausência no aumento de expressão dessa proteína, não significam que determinada estrutura não esteja envolvida de alguma forma nos comportamentos observados, já que isso também não significa que o núcleo não tenha sido ativado ou inativado (ZIÓLKOWSKA et al., 2002).

Durante a expressão da resposta contextual de defesa social, notamos um aumento significativo da expressão da proteína Fos na parte ventrolateral do núcleo ventromedial (VMHvl) e na parte tuberal do hipotálamo lateral (LHA_{tu}). Notamos ainda, clara tendência no aumento da mobilização dos núcleos pré-óptico medial (MPN) e pré-mamilar ventral (PMV). Em conjunto, o MPN, VMHvl/LHA_{tu} e o PMV formam um circuito no hipotálamo medial que é responsivo às pistas de outros co-específicos, também chamado de circuito socialmente responsivo da zona medial do hipotálamo (CANTERAS, 2002; SWANSON, 2000). De acordo com Swanson (2000) este circuito seria um dos principais responsáveis para controlar uma série de comportamentos sociais, tais como, acasalamento, comportamento maternal, agressão intra-específica e defesa social. Notamos que o mesmo circuito também está mobilizado durante a derrota social (KOLLACK-WALKER; WATSON; AKIL, 1997; KOLLACK-WALKER et al., 1999; MOTTA et al., 2009; VEENING et al., 2005;).

Todavia, o principal sítio hipotalâmico mobilizado durante a resposta contextual de defesa social é o núcleo pré-mamilar dorsal. As contagens de células no PMD mostraram de forma clara que a parte dorsomedial desse núcleo é mobilizada, assim como observado nos animais derrotados durante o encontro

agonístico (MOTTA et al., 2009). Entretanto, a análise estatística indicou também um aumento da atividade da parte ventrolateral quando o grupo Contexto é comparado com o controle de Cheiro. Interessante notar que os dois controles, nesse caso, não diferem entre si. Provavelmente, essa diferença estatística do grupo Contexto com o controle de Cheiro tenha se dado por uma questão de espaço amostral, o que acabou culminando em variações encontradas ao acaso, sem um significado fisiológico.

Estudos de nosso laboratório indicam que o circuito socialmente responsivo da zona medial do hipotálamo se liga a parte dorsomedial do PMD (via região projeções para região subfornical do hipotálamo lateral). Desta forma, notamos que os mesmos circuitos mobilizados durante o encontro agonístico social (quando o intruso apresenta respostas inatas de defesa) são também mobilizados quando o intruso é exposto ao contexto associado a derrota social (respostas de contextuais de defesa). Interessantemente, lesões do PMD praticamente abolem a resposta passivas de defesa frente ao residente (MOTTA et al., 2009), e estudos em curso em nosso laboratório indicam que a inativação por muscimol do PMD também reduz significativamente as respostas contextuais de defesa em resposta a derrota social.

A maneira pela qual o PMD pode influenciar as respostas de defesa contextual seria através de sua projeção para a matéria cinzenta periaquedutal (PAG), em particular o seu setor dorsomedial (PAGdm), por representar um dos principais alvos da parte dorsomedial do PMD (MOTTA et al., 2009). Embora não tenhamos um aumento na expressão da proteína Fos na PAG durante a expressão da resposta contextual de defesa social, estudos em curso em nosso laboratório apontam que a inativação por Muscimol da parte dorsal da PAG praticamente abole as respostas de defesa contextual observadas após a derrota social.

Na amígdala observamos uma nítida tendência no aumento da expressão da proteína Fos na parte póstero-dorsal do núcleo medial da amígdala (MEApd) e no núcleo basolateral anterior (BLA). O MEApd recebe informações feromonais do bulbo olfativo acessório e se projeta para o circuito socialmente responsivo da zona medial do hipotálamo (CANTERAS, 2002; SWANSON, 2000). Notadamente, este sítio neural também é mobilizado durante o encontro com o co-específico agressivo (MOTTA et al, 2009). No presente caso, comparando os animais expostos ao contexto da derrota social com aqueles expostos somente ao cheiro, notamos que a derrota social de alguma forma aumenta a responsividade deste sítio neural,

possivelmente refletindo algum mecanismo de memória social. Corroborando os nossos achados, Markham e Huhman (2008) mostraram que o MEA está envolvido tanto na expressão quanto na aquisição da “derrota condicionada” descrita em hamsters.

O hipotálamo medial, além de receber as pistas olfatórias pelo MEA, recebe informações contextuais, que são importantes na associação do ambiente com a interação social aversiva que ocorreu no dia anterior. Essa ligação pode utilizar o septo lateral rostral (LSr) e a área hipotalâmica lateral juxtadorsomedial (LHAjd). O LSr estava significativamente mobilizado nos animais derrotados expostos ao contexto. Sua importância na expressão dos comportamentos de defesa no contexto é devido a suas projeções do hipocampo ventral (RISOLD; SWANSON, 1996, 1997). O LSr, por sua vez, se projeta para todo o hipotálamo medial (RISOLD; SWANSON, 1996) e para áreas do hipotálamo lateral, como o LHAjd (HAHN; SWANSON, 2012). Markham et al. (2012) mostraram que o hipocampo ventral é importante na aquisição da “derrota condicionada” em hamsters e provavelmente o LSr é um importante elemento da circuitaria mediando a aquisição e expressão desse fenômeno. A conexão entre o hipotálamo e o hipocampo pode ser de forma mais direta via a LHAjd que por fim, se projeta para o PMDdm, importante elemento na organização dos comportamentos de defesa intra-específica (HAHN; SWANSON, 2012).

Outro sítio neural relacionado às pistas contextuais, visto receber projeções de áreas corticais associativas de terceira ordem, é o BLA (SWANSON; PETROVICH, 1998); Jasnow et al. (2005) e Markham e Huhman (2008) reportam um papel do BLA na aquisição da “derrota condicionada” em hamsters. Foi observado um aumento da expressão de proteína Fos desse núcleo no presente trabalho, embora suas conexões não sugere uma influência direta dele no hipotálamo, sendo mais importante, talvez, na regulação de processos cognitivos e afetivos de áreas corticais frontais via núcleos da base (SWANSON; PETROVICH, 1998). São necessários mais estudos para compreender como o BLA faz parte do circuito na expressão dos comportamentos de defesa na exposição ao contexto da derrota social.

Conforme ilustramos no diagrama da Figura 9, é possível inferir um provável circuito envolvido nas respostas observadas durante a exposição ao contexto de uma derrota social. O MEApd detecta as pistas olfatórias e o hipocampo ventral as

pistas contextuais. O MEApd, por sua vez, alimenta o circuito socialmente responsivo da zona medial do hipotálamo, enquanto o hipocampo ventral se projeta para o septo lateral rostral (LSr). O LSr seria um elemento chave na veiculação de pistas contextuais tanto para elementos do circuito socialmente responsivo da zona medial do hipotálamo como para o LHAjd, e ambos convergem para a parte dorsomedial do PDM. Este, por sua vez se projeta para a PAGdm, que seria um elemento chave para a expressão da resposta de defesa contextual.

Figura 9 - Diagrama esquemático mostrando os sistemas neurais provavelmente envolvidos na expressão dos comportamentos de defesa na exposição ao ambiente contextual de uma derrota social.

FONTE: Rangel Jr (2012).

6 CONCLUSÕES

Em resumo, no presente trabalho desenvolvemos um paradigma experimental para o estudo das respostas de defesa contextual observadas após a derrota social. Além disso, nossos dados ajudam a revelar os circuitos neurais envolvidos nestas respostas. De interesse particular, a semelhança do que foi observado para as ameaças predatórias, notamos que no embate social, a situação de defesa inata e contextual também compartilham os mesmos circuitos neurais.

REFERÊNCIAS*

- BANDLER, R.; SHIPLEY, M. T. Columnar organization of the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression. **Trends in Neuroscience**, v. 17, n. 19, p. 379-389, 1994.
- BARTOLOMUCCI, A.; PALANZA, P.; SACERDOTE, P.; PANERAI, A. E.; SGOIFO, A.; DANTZER, R.; PARMIGIANI, S. Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 67-81, 2005
- BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress in Neurobiology**, v. 46, p. 575-605, 1995.
- BLANCHARD, R. J.; YUDKO, E. B.; BLANCHARD, D. C. Alcohol, aggression and the stress of subordination. **Journal of Studies on Alcohol and Drugs**, v. 11, p. 146-155, 1993.
- BLANCHARD, D. C.; SAKAI, R. R.; MCEWEN, B.; WEISS, S. M.; BLANCHARD, R. J. Subordination stress: behavioural, brain, and neuroendocrine correlates. **Behavioural Brain Research**, v. 58, p. 113-121, 1993.
- BLANCHARD, D. C.; SPENCER, R. L.; WEISS, S. M.; BLANCHARD, R. J.; MCEWEN, B.; SAKAI, R. R. Visible burrow system as a model of chronic social stress: behavioral and neuroendocrine correlates. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, p. 117-134, 1995.
- BLANCHARD, R. J.; MCKITTRICK, C. R.; BLANCHARD, D. C. Animals models of social stress: Effects on behavior and brain neurochemical systems. **Physiology & Behaviour**, v. 73, p. 261-271, 2001.
- BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 97-116, 2003.
- CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. The dorsal premammillary nucleus: An unusual component of the mammillary body. **Neurobiology**, v. 89, p. 10089-10083, 1992.
- CANTERAS, N. S.; SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 360, n. 2, p. 213-245, 1995.

* De acordo com:

CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and function implications. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 71, p. 481-491, 2002.

CANTERAS, N. S.; KROON, J. A.; DO MONTE, F. H.; PAVESI, E.; CAROBREZ, A. P. Sensing danger through the olfactory system: the role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 7, p. 1228-1235, 2008.

CEZÁRIO, A. F.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; BALDO, M. V. C.; CANTERAS, N. S. Hypothalamic sites responding to predator threats – the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 1003-1015, 2008.

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

CORRIGAN, J. G.; FLANELLY, K. J. Ultrasonic vocalizations of defeated male rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 93, p. 105-115, 1979.

HAHN, J. D.; SWANSON, L. W. Connections of the Lateral Hypothalamic Area Juxtadorsomedial region in the male rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 520, p. 1831-1890, 2012.

HANEY, M.; MACCARI, S.; LE MOAL, M.; SIMON, H.; PIAZZA, P. V. Social stress increases the acquisition of cocaine self-administration in male and female rats. **Brain Research**, v. 698, p. 46-52, 1995.

HUHMANN, K. L.; MOORE, T.; FERRIS, C.; MOUGEY, E. H.; MEYERHOFF, J. L. Acute and repeated exposure to social conflict in male golden hamsters: Increases in plasma POMC-peptides and cortisol and decreases in plasma testosterone. **Hormones and Behaviour**, v. 25, p. 200-216, 1991.

HUHMANN, K. L.; SOLOMON, M. B.; JANICKI, M.; HARMON, A. C.; LIN, S. M.; ISRAEL, J. E.; JASNOW, A. M. Conditioned defeat in male and female Syrian hamsters. **Hormones and Behavior**, v. 44, p. 293-299, 2003.

JASNOW, A. E.; DAVIS, M.; HUHMANN, K. L. Involvement of Central Amygdala and Bed Nucleus of Stria Terminalis corticotropin-releasing factor in behavioral responses to social defeat. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, n. 5, p. 1052-1061, 2004.

JASNOW, A. W.; SHI, C.; ISRAEL, J. E.; DAVIS, M.; HUHMANN, K. L. Memory of social defeat is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdala. **Behavioral Neuroscience**, v. 119, n. 4, p. 1125-1130, 2005.

KEAY, K. A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 669-678, 2001.

KOLLACK-WALKER, S.; WATSON, S. J.; AKIL, H. Social stress in hamsters: Defeat activates specific neurocircuits within the brain. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 22, p. 8842-8855, 1997.

KOLLACK-WALKER, S.; DON, C.; WATSON, S. J.; AKIL, H. Differential expression of c-fos mRNA within neurocircuits of male hamsters exposed to acute or chronic defeat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 11, p. 547-559, 1999.

KOOLHAAS, J. M.; HERMAN, P. M.; KEMPERMAN, C.; BOHUS, B.; VAN DEN HOOFDACKER, R. H.; BEERSMA, D. G. M. Single social defeat in rats induces a gradual but long lasting behavioural change: a model of depression? **Neuroscience Research Communications**, v. 7, p. 35-41, 1990.

KOOLHAAS, J. M.; MEERLO, P.; DE BOER, S. F.; STRUBBE, J. H.; BOHUS, B. The Temporal Dynamics of the Stress Response. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 21, p. 775-782, 1997.

KOOLHAAS, J. M.; KORTE, S. M.; DE BOER, S. F.; VAN DER VEGT, B. J.; VAN REENEN, C. G.; HOPSTER, H.; DE JONG, I. C.; RUIS, M. A. W.; BLOKHUIS, H. J. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 925-935, 1999.

KREBS, J. R.; DAVIES, N. B. **Introdução à ecologia comportamental**. São Paulo: Atheneu, 1996. 420 p.

LEDOUX, J. E. Emotions circuits in the brain. **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 23, p. 155-184, 2000.

MARKHAM, C. M.; HUHMAN, K. L. Is the medial amygdala part of the neural circuit modulating conditioned defeat in Syrian Hamsters? **Learning & Memory**, v. 15, p. 6-12, 2008.

MARKHAM, C. M.; NORVELLE, A.; HUHMAN, K. L. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the acquisition and the expression of conditioned defeat in Syrian hamsters. **Behavioral Brain Research**, v. 198, p. 69-73, 2009.

MARKHAM, C. M.; TAYLOR, S. L.; HUHMAN, K. L. Role of the amygdala and hippocampus in the neural circuit subserving conditioned defeat in Syrian hamsters. **Learning & Memory**, v. 19, p. 256-263, 2012.

MARTINEZ, M.; PHILIPS, P. J.; HERBERT, J. Adaptation in patterns of c-fos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, p. 20-33, 1998.

MARTINEZ, M.; CALVO-TORRENT, A.; PICO-ALFONSO, M. A. Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: a review. **Aggressive Behaviour**, v. 24, p. 241-256, 1998.

MARTINEZ, M.; CALVO-TORRENT, A. HERBERT, J. Mapping brain response to social stress in rodents with c-fos expression: a review. **Stress**, v. 5, p. 3-13, 2002.

MATSUDA, S.; PENG, H.; YOSHIMURA, H.; WEN, T. C.; FUKUDA, T.; SAKANAKA, M. Persistent c-fos expression in the brains of mice with chronic social stress. **Neuroscience Research**, v. 26, p. 157-170, 1996.

MCDONALD, M. M.; MARKHAM, C. M.; NORVELLE, A.; ALBERS, H. E.; HUHMANN, K. L. GABA_A receptor activation in the lateral septum reduces the expression of the conditioned defeat and increases aggression in Syrian hamsters. **Brain Research**, v. 1439, p. 27-33, 2012.

MEERLO, P.; OVERKAMP, J. F.; DAAN, S.; VAN DEN HOOFDAKKER, R. H.; KOOLHAAS, J. M. Changes in behaviour and body weight following a single or double social defeat in rats. **Stress**, v. 1, p. 21-32, 1996a.

MEERLO, P.; OVERKAMP, G. J. F.; BENNING, M. A.; KOOLHAAS, J. M.; VAN DEN HOOFDAKKER, R. H. Long term changes in open field behavior following a single social defeat in rats can be reversed by sleep deprivation. **Physiology and Behaviour**, v. 60, p. 115-119, 1996b.

MEERLO, P.; DE BOER, S. F.; KOOLHAAS, J. M.; DAAN, S.; VAN DEN HOOFDAKKER, R. H. Changes in daily rhythms of body temperature and activity after a single social defeat in rats. **Physiology & Behavior**, v. 59, p. 735-739, 1996c.

MICZEK, K. A. A new test for aggression in rats without aversive stimulation: differential effects of d-amphetamine and cocaine. **Psychopharmacology**, v. 60, p. 253-259, 1979.

MICZEK, K. A.; WEERTS, E. M.; TORNATZKY, W.; DEBOLD, J. F.; VATNE, T. M. Alcohol and "bursts" of aggressive behavior: ethological analysis of individual differences in rats. **Psychopharmacology**, v. 107, p. 551-563, 1992.

MOTTA, S. C.; GOTO, M.; GOUVEIA, F. V.; BALDO, M. V. C.; CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 106, p. 4870-4875, 2009.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J. MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of Depression. **Neuron**, v. 34, p. 13-25, 2002.

NIKULINA, E. M.; MARCHAND, J. E.; KREAM, R. M.; MICZEK, K. A. Behavioral sensitization to cocaine after a brief social stress is accompanied by changes in Fos expression in the murine brainstem. **Brain Research**, v. 810, p. 200-210, 1998.

POTEGAL, M.; HUHMANN, K.; MOORE, T.; MEYERHOFF, J. Conditioned defeat in the Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*). **Behavioural and Neural Biology**, v. 60, p. 93-102, 1993.

RAZZOLI, M.; RONCARI, E.; GUIDI, A.; CARBONI, L.; ARBAN, R.; GERRARD, P.; BACCHI, F. Conditioning properties of social subordination in rats: Behavioral and biochemical correlates of anxiety. **Hormones and Behavior**, v. 50, p. 245-251, 2006.

RAZZOLI, M.; CARBONI, L.; GUIDI, A.; GERRARD, P.; ARBAN, R. Social defeat-induced contextual conditioning differentially imprints behavioral and adrenal reactivity: a time course study in rat. **Physiology & Behavior**, v. 92, p. 734-740, 2007.

RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S.; CEZÁRIO, A. F.; BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Na alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1255-1263, 2005.

RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. **Science**, v. 272, p. 1484-1486, 1996.

RISOLD, P. Y.; THOMPSON, R. H.; SWANSON, L. W. The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. **Brain Research Reviews**, v. 24, p. 197-254, 1997.

RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. Connections of the rat lateral septal complex. **Brain Research Reviews**, v. 24, p. 115-195, 1997.

SAPOLSKY, R. M. The endocrine-stress response and social status in wild baboon. **Hormones and Behavior**, v. 16, p. 279-292, 1982.

STRAKALOVA, T.; SPANAGEL, R.; BARTSCH, D.; HENN, F. A.; GASS, P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, p. 2007-2017, 2004.

SWANSON, L. W.; PETROVICH, G. D. What is amygdala? **Trends in Neuroscience**, v. 21, p. 323-331, 1998.

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

SWANSON, L. W. **Brain maps**: structure of the rat brain. an atlas with printed and electronic templates for data, models and schematics. Amsterdã: Elsevier, 2004.

VEENING, J. G.; COOLEN, L. M.; DE JONG, T. R.; JOOSTEN, H. W.; DE BOER, S. F.; KOOLHAS, J. M.; OLIVIER, B. Do similar neural systems subserve aggressive and sexual behavior in male rats? Insights from c-Fos and pharmacological studies. **European Journal of Pharmacology**, v. 526, p. 226-239, 2005.

ZIÓLKOWSKA, B.; PRZEWLOCKI, R. Methods used in inducible transcription factor studies: Focus on mRNA. In: BJÖRKLUND, A.; HÖKFELT, T. (Org.) **Handbook of chemical neuroanatomy**: immediate early genes and inducible transcription factors in mapping of the central nervous system function and dysfunction. Amsterdã: Elsevier, 2002. v. 19, p. 1-39.