

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

ÉRIKA TISSIANA STERDE

**Estudo anatômico e funcional das projeções eferentes  
gabaérgicas do núcleo medial da amígdala mobilizados  
na organização da defesa social**

São Paulo  
2021

ÉRIKA TISSIANA STERDE

**Estudo anatômico e funcional das projeções eferentes  
gabaérgicas do núcleo medial da amígdala mobilizados  
na organização da defesa social**

**Versão Corrigida**

(Versão original encontra-se na unidade que aloja  
o Programa de Pós-graduação)

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

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Simone Cristina Motta

São Paulo  
2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Sterde, Érika Tissiana

Estudo anatômico e funcional das projeções eferentes gabaérgicas do núcleo medial da amígdala mobilizados na organização da defesa social / Érika Tissiana Sterde; orientador Simone Cristina Motta. -- São Paulo, 2021.  
52 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Comportamento defensivo animal. 2. Neuroanatomia funcional . 3. Derrota social. 4. Estresse social. 5. Circuitos neurais. I. Motta, Simone Cristina, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Érika Tissiana Sterde

Titulo da Dissertação/Tese: Estudo anatômico e funcional das projeções eferentes gabaérgicas do núcleo medial da amígdala mobilizados na organização da defesa social

Orientador: Profª Dr Simone Cristina Motta

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

( ) **Aprovado(a)**                      ( ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho,*

*À Deus que me fez sonhar e realizou muito além do que eu poderia ter sonhado.*

*Aos meus pais e irmãos, que me ensinaram a ser forte e ter coragem para conquistar meus objetivos. Meu amor por vocês é infinito!*

*Ao meu companheiro João, por estar na minha vida, acreditar em mim, ajudar e apoiar em todos os momentos, e por ser parte desse processo.*

## **AGRADECIMENTOS**

A conclusão deste trabalho faz parte do meu crescimento pessoal e profissional, então agradeço a todos que cruzaram meus caminhos, e de forma direta ou indireta mudou ou acrescentou algo em minha vida para que eu chegasse aqui.

À minha orientadora professora Simone Cristina Motta, pela oportunidade e principalmente por ter acreditado no potencial do meu trabalho. Agradeço por todos os ensinamentos e por me manter motivada quando tudo parecia estar dando errado.

Aos colegas do laboratório, agradeço as contribuições, trocas, conversas, os momentos de alegria e desespero, especialmente agradeço a Amanda, Carolzinha, Gabi e o Rangel também pela amizade.

Aos professores membros nas bancas examinadora, agradeço por aceitarem o convite, disponibilizarem sua atenção e contribuírem para a melhoria desse trabalho.

Aos professores e funcionários do departamento de anatomia (ICB-USP) e do programa de pós-graduação em Biologia de Sistemas (ICB-USP), agradeço por proporcionarem todo o suporte para o desenvolvimento deste projeto.

Aos sujeitos utilizados nesta pesquisa, meu respeito e agradecimento por suas vidas, sem elas não seria possível a realização deste trabalho e o aprofundamento dos conhecimentos científicos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa. Processo nº 2008/12763-2

## RESUMO

STERDE, E. T. **Estudo anatômico e funcional das projeções eferentes gabaérgicas do núcleo medial da amígdala mobilizados na organização da defesa social**. 2020. 52f. Dissertação (mestrado em Biologia de sistema, área de concentração, ciências morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2021.

O núcleo medial da amígdala (MeA) tem papel fundamental nos comportamentos sociais, pois processa as pistas olfativas, e as projeta para regiões hipotalâmicas para organizar respostas comportamentais corretas às informações recebidas. Em nosso estudo, mapeamos as projeções gabaérgicas eferentes das diferentes porções do MeA e investigamos funcionalmente os neurônios gabaérgicos do MeA na defesa social. Os resultados mostraram que o MeApd envia projeções gabaérgicas para o núcleo da estria terminal, porção principal (BSTpr), núcleo pré-mamilar ventral (PMV) e para o núcleo pré-óptico medial (MPN). Este último, o MPN, não recebe projeções gabaérgicas da porção anterior (MeAa) e posteroventral (MeApv), conforme previamente descrito na literatura. Também encontramos poucas projeções gabaérgicas do MeA para o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH), outra diferença em relação a literatura. Os resultados dos estudos funcionais mostram alterações comportamentais no tempo total de comportamentos sociais e exploratórios, que foram maiores no grupo experimental quando comparado o grupo controle e observamos uma redução do tempo gasto em comportamentos defensivos, como defesa total e defesa passiva, no grupo experimental comparado ao grupo controle. Não vimos diferenças entre os grupos em relação às mordidas recebidas do residente e ao tempo total de defesa ativa. Nossos resultados indicam que os neurônios gabaérgicos do MeApd modulam a defesa social, e a perda da função gabaérgica afeta diretamente os comportamentos expressos diante de um encontro agonístico com um coespecífico. Vimos também que é possível que o MeApd exerça suas funções na defesa social por meio do BST ou PMV.

**Palavras-chave:** Circuito neural, Derrota Social, Estresse Social, Hipotálamo, GABA.

## ABSTRACT

STERDE, E. T. **Anatomical and functional study of the efferent gabaergic projections of the medial amygdala nucleus mobilized in the organization of social defense**. 2020. 52p. Master thesis (System biology; area of concentration morphofunctional sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2021.

The medial nucleus of the amygdala (MeA) plays a fundamental role in social behaviors, as it processes olfactory cues, and projects them to hypothalamic regions to organize suitable behavioral responses according to the received information. In our study, we mapped the efferent gabaergic projections of the different subdivisions of MeA and functionally investigated the gabaergic MeA neurons in social defense. The results showed that MeApd sends gabaergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis, principal part (BSTpr), to the ventral premammillary nucleus (PMV) and to the medial preoptic nucleus (MPN). We did not find gabaergic projections from the anterior MeA (MeAa) or posteroventral MeA (MeApv) to MPN, as previously described in the literature. Also different to the literature, we hardly found gabaergic projections from MeA to the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH). The results of the functional studies showed behavioral changes in the total time spent in social and exploratory behaviors, which were greater in the experimental group when compared to the control group and we observed a reduction in the time spent in defensive behaviors, such as total defense and passive defense, in the experimental group. We did not see any differences between the groups regarding the bites received from the resident and the total time of active defense. Our results indicate that MeApd gabaergic neurons modulate social defense, and the loss of gabaergic function directly affects the behaviors expressed in the face of an agonistic encounter with a conspecific. We also saw that it is possible for MeApd to exert its functions in social defense through BST or PMV.

**Keywords:** Neural circuit, Social Defeat, Social Stress, Hypothalamus, GABA.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama de órgão vomeronasal de roedores e conexões sociais .	15
Figura 2 - Esquema demonstrando as conexões entre os núcleos envolvidos na derrota social.....	18
Figura 3 – Comportamentos agonístico de camundongos em um conflito social .....	19
Figura 4 - Esquema do delineamento experimental 1 .....	21
Figura 5 - Esquema do delineamento experimental 2 .....	22
Figura 6 – Arena do teste de campo aberto .....	24
Figura 7 - Fotomicrografia de cortes frontal de camundongo macho VgatCRE (caso vgatMacho25), que recebeu injeção do vírus <i>AAV5.EF1a-DIO.eNPHR3.0-EYFP</i> (15 nl) no MeAanterior .....	30
Figura 8 - Fotomicrografia de cortes frontal de camundongo macho VgatCRE (caso VgatMacho26), que recebeu injeção do vírus <i>AAV5.EF1a-DIO.eNPHR3.0-EYFP</i> (15 nl) no MeApd rostral.....	31
Figura 9 - Fotomicrografia de cortes frontal de camundongo macho Vgat <sup>CRE</sup> (caso Vgatmacho27), que recebeu injeção do vírus <i>AAV5.EF1a-DIO.eNPHR3.0-EYFP</i> (15 nl) no MeApd caudal. ....	31
Figura 10 - Fotomicrografia de cortes frontal de camundongo macho e fêmea VgatCRE (casos Vgatmacho29 e Vgafêmea37), que receberam injeção do vírus <i>AAV5.EF1a-DIO.eNPHR3.0-EYFP</i> (15 nl) no MeApd .....	32
Figura 11- Fotomicrografia de cortes frontal de camundongo fêmea Vgat <sup>CRE</sup> (caso VgatFêmea38), que recebeu injeção do vírus <i>AAV5.EF1a-DIO.eNPHR3.0-EYFP</i> (15 nl) no MeApv.....	33
Figura 12 - Fotomicrografia de cortes frontal de camundongo macho Vgat <sup>CRE</sup> (caso Vgat12macho), imunoreagido com anticorpo (anti-GFP) que recebeu injeção do vírus <i>AAV5.Ef1a-DIO.hCHR2(H134R)EYFP</i> (15nl) no MeApd .....	34
Figura 13 - Fotomicrografia de cortes frontal de camundongos Vgat <sup>Flox</sup> (caso VgatFlox28) com injeção bilateral do vírus <i>AAV5-CMV-CRE-GFP</i> no MeA.....	35

Figura 14 - Comparação das médias de duração dos comportamentos em segundos, nos grupos Controle e Experimental nos casos Vgat <sup>Flox</sup> .....	37
Figura 15 - Comparação das médias da quantidade de mordidas dadas e recebidas, nos grupos Controle e Experimental nos casos Flox.....	38
Figura 16 - Fotomicrografia de cortes frontal de camundongos Vgat <sup>Flox</sup> (caso Controle, Vgat <sup>Flox</sup> C32 e Experimental, Vgat <sup>Flox</sup> 11) imunoreagido com anticorpo (anti- Fos) que receberam injeção bilateral no MeA. 40	
Figura 17 - Esquema demonstrando as conexões entre os núcleos envolvidos em um possível circuito gabaérgico de defesa social. ....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Resultado do teste de campo aberto.....	34
Tabela 2 – Dados comportamentais quantificados em tempo total de duração em segundos, e em quantidade total de mordidas dadas e recebidas em cada caso nos grupos Controle e Experimental .....	36
Tabela 3 - Resultado do teste paradigma residente-intruso.....	39

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Experimentos, animais e vírus.....	23
Quadro 2 – Comportamentos do intruso analisados .....	25
Quadro 3 - Concentração dos Anticorpos durante a incubação no processamento de imunoquistoquímica .....	27
Quadro 4 - Local das injeções de rastreamento das projeções eferentes gabaérgicas.....	29

## LISTA DE SIGLAS

Arc	Núcleo arqueado do hipotálamo
AOB	Núcleo olfatório acessório
BST	Núcleo intersticial da estria terminal
BSTif/tr	Núcleo intersticial da estria terminal, parte interfascicular e transversal
BSTpr	Núcleo intersticial da estria terminal, parte principal
MeA	Núcleo medial da amígdala
MeAa	Núcleo medial da amígdala, porção anterior
MeApd	Núcleo medial da amígdala, porção posterodorsal
MeApv	Núcleo medial da amígdala, porção posteroventral
MPN	Núcleo pré-óptico medial
Opt	Trato óptico
PMD	Núcleo pré-mamilar dorsal
PMV	Núcleo pré-mamilar ventral
PVH	Núcleo paraventricular do hipotálamo
VMH	Núcleo ventromedial do hipotálamo
VMHvl	Núcleo ventromedial do hipotálamo, parte ventrolateral
3V	Terceiro ventrículo

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
1.1	Comportamentos sociais.....	14
1.2	Comportamentos defensivos inatos .....	15
1.3	O núcleo medial da amígdala e suas conexões hipotalâmicas .....	16
1.4	Neurônios gabaérgicos do MeA .....	17
1.5	Modelos de estudo animal .....	18
1.6	Objetivos .....	20
2	METODOLOGIAS .....	21
2.1	Desenho experimental - Estudo das eferências gabaérgicas do MeA (Experimento 1).....	21
2.2	Desenho experimental - Retirada do GABA como neurotransmissor de neurônios do MeA (Experimento 2).....	21
2.3	Animais e vírus utilizados.....	22
2.4	Cirurgia estereotáxica para injeção viral .....	22
2.5	Protocolos Experimentais.....	23
2.5.1	Teste de Campo aberto. ....	23
2.5.2	Teste comportamental: Paradigma Residente-Intruso.....	24
2.6	Perfusão.....	26
2.7	Microtomia.....	26
2.8	Imunohistoquímica .....	26
2.9	Análise das Imagens .....	27

2.10	Análise estatística .....	28
3	RESULTADOS .....	29
3.1	Resultados Experimento 1 .....	29
3.1.1	Cirurgia estereotáxica .....	29
3.1.2	Projeções eferentes gabaérgicas do MeAnterior .....	30
3.1.3	Projeções eferentes gabaérgicas do MeApd .....	30
3.1.4	Projeções eferentes gabaérgicas do MeApv.....	33
3.2	Resultados experimento 2.....	34
3.2.1	Teste de campo aberto .....	34
3.2.2	Teste comportamental .....	35
3.2.3	Imunorreação pra Fos: Ativação neuronal .....	39
4	DISCUSSÃO .....	41
5	CONCLUSÕES .....	46
6	REFERÊNCIAS <sup>1</sup> .....	47

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Comportamentos sociais

Comportamentos sociais são estratégias evolutivas que consistem na interação entre indivíduos da mesma espécie garantindo lhes sobrevivência e reprodução. Circuitos complexos, interligados e dimórficos, ou seja, distintos em machos e fêmeas (Billing e col., 2020; Yang e col., 2020), são mobilizados e desencadeiam reações comportamentais adequadas a situação e as informações quimiossensoriais e olfativas recebidas do coespecífico ou do ambiente (LeDoux, 2012; Stowers e col., 2013; Chen and Hong, 2018; Li e Dulac, 2018).

O processamento dessas informações sociais auxilia na identificação de um potencial parceiro de acasalamento, defesa do território e estabelecimento de hierarquia e submissão e as respostas emitidas nesses contextos podem ser inatas ou aprendidas (LeDoux, 2013).

O repertório de comportamentos aprendidos é estruturado e adequado as experiências prévias do indivíduo. Já as reações inatas são os comportamentos que os animais exibem sem a necessidade de aprendê-los, que são as reações pré-programadas geneticamente (Lischinsky, e col., 2017), que garantem maiores chances de sobreviver, como por exemplo em situações que não há a possibilidade de escapar (Inagaki e col., 2014).

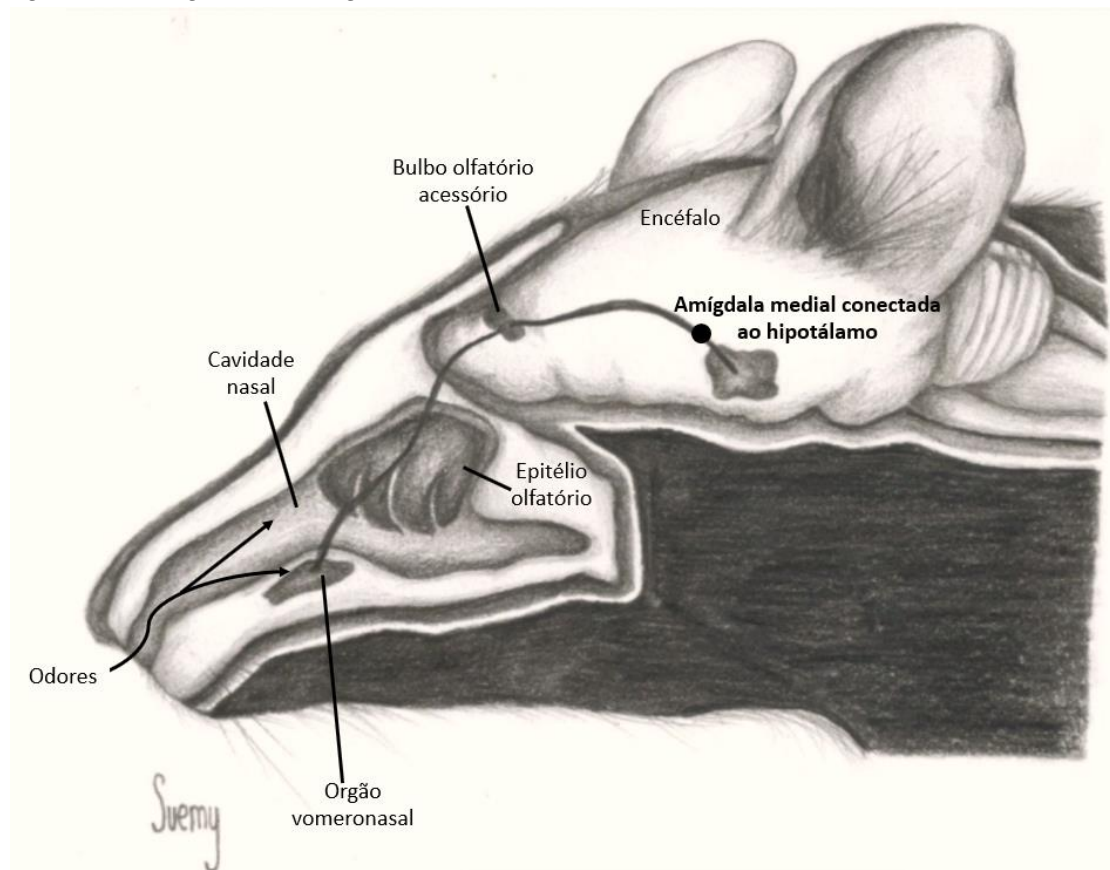
Chen e Hong (2018) discutem o comportamento social em roedores e definem três estágios para o estabelecimento de determinadas reações comportamentais, 1) reconhecimento e integração de pistas sensoriais de um coespecífico, 2) processamento adicional de informações sensoriais para gerar uma decisão comportamental e 3) influência das mudanças de estado interno na seleção de escolhas comportamentais.

O primeiro estágio o animal recebe as pistas olfativas, como informações feromonais detectados pelo órgão vomeronasal (Dulac e Torello, 2003), que são enviadas para regiões da amígdala por intermédio do bulbo olfatório acessório (AOB) (Bergan e col., 2014; Carvalho e col., 2015). Na amígdala, mais



especificamente no núcleo medial da amígdala (MeA) essas informações são processadas e projetadas para regiões hipotalâmicas que controlam comportamentos sociais (Figura 1) que Chen e Hong (2018) descrevem como segundo estágio, e finalmente no terceiro estágio, a expressão comportamental adequada a situação.

Figura 1 – Diagrama de órgão vomeronasal de roedores e conexões sociais



Adaptado de ilustração cedida por Suemy Melim Yamada, laboratório de neuroanatomia funcional, ICB-USP (não publicado), edição e publicação permitida pelo ilustrador. Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

## 1.2 Comportamentos defensivos inatos

As respostas comportamentais defensivas são essenciais para a sobrevivência quando desencadeada diante de um estímulo nocivo ou uma ameaça eminente e fazem parte de comportamentos sociais geneticamente programados para garantir a reprodução e a sobrevivência da espécie (LeDoux, 2013).

Comportamentos defensivos são também desencadeados diante de situações de ameaças de um predador, além da exposição a um coespecífico agressivo, diminuindo as chances de ferimentos severos e morte (Fanselow e Ponnusamy, 2008; LeDoux, 2013). A ameaça quando parte de um predador é conhecida como interespecífica e desencadeia comportamentos de defesa interespecífica em seu oponente. Já a ameaça quando parte de um indivíduo da mesma espécie, diante de situações de competições e/ou dominâncias, essa ameaça é chamada de intraespecífica, que geralmente parte de um coespecífico dominante, e o seu oponente manifesta comportamentos de defesa intraespecífica, também chamada de defesa social.

Essas respostas defensivas são desencadeadas a partir das informações processadas pelo MeA, e transmitidas a núcleos hipotalâmicos que são conhecidos por regular comportamentos sociais (Motta e col., 2013; Chen e Hong, 2018).

### **1.3 O núcleo medial da amígdala e suas conexões hipotalâmicas**

O núcleo medial da amígdala (MeA) é uma subdivisão da amígdala, localizada dentro do lobo temporal anterior, presente em roedores e humanos, e desempenha papel importante no controle de comportamentos sociais e/ou emocionais e afetivos (Nordman e col, 2020; White e col, 2018).

Em roedores o MeA integra as informações sociais recebidas do sistema olfatório e vomeronasal com núcleos hipotalâmicos sexualmente dimórficos, diferentes morfologicamente e funcionalmente, em machos e fêmeas (Yang e col., 2020), mobilizados na organização de diversos comportamentos sociais (Motta e col., 2013; Hashikawa e col., 2016; Yang e col., 2013; Westberry e Meredith, 2016) e que participam na modulação de comportamentos defensivos inatos (Canteras, 2002; Motta e col., 2009).

No hipotálamo, encontramos um circuito ativado em respostas defensivas intraespecíficas composto pelo núcleo ventromedial do hipotálamo, parte ventrolateral (VMHvl) e pelo núcleo pré-mamilar ventral (PMV, Motta e col., 2009). Os elementos desse circuito hipotalâmico recebem projeções do núcleo medial da amígdala, porção posterodorsal (MeApd, Canteras e col., 1995-

estudo em ratos; Pardo-Bellver e col., 2012- estudo em camundongos fêmeas; Choi e col., 2005 e Usunoff e col., 2009- estudo em camundongos macho) sendo essa estrutura mobilizada em diferentes comportamentos sociais (Motta e col., 2009 e 2013; Westberry e Meredith, 2017).

O MeApd também se projeta para o núcleo intersticial da estria terminal (BST, Canteras e col., 1995; Pardo-Bellver e col., 2012; Choi e col., 2005; Usunoff e col., 2009; Padilha e col., 2016), componente chave na integração de respostas fisiológicas e comportamentais (Crestani e col., 2013).

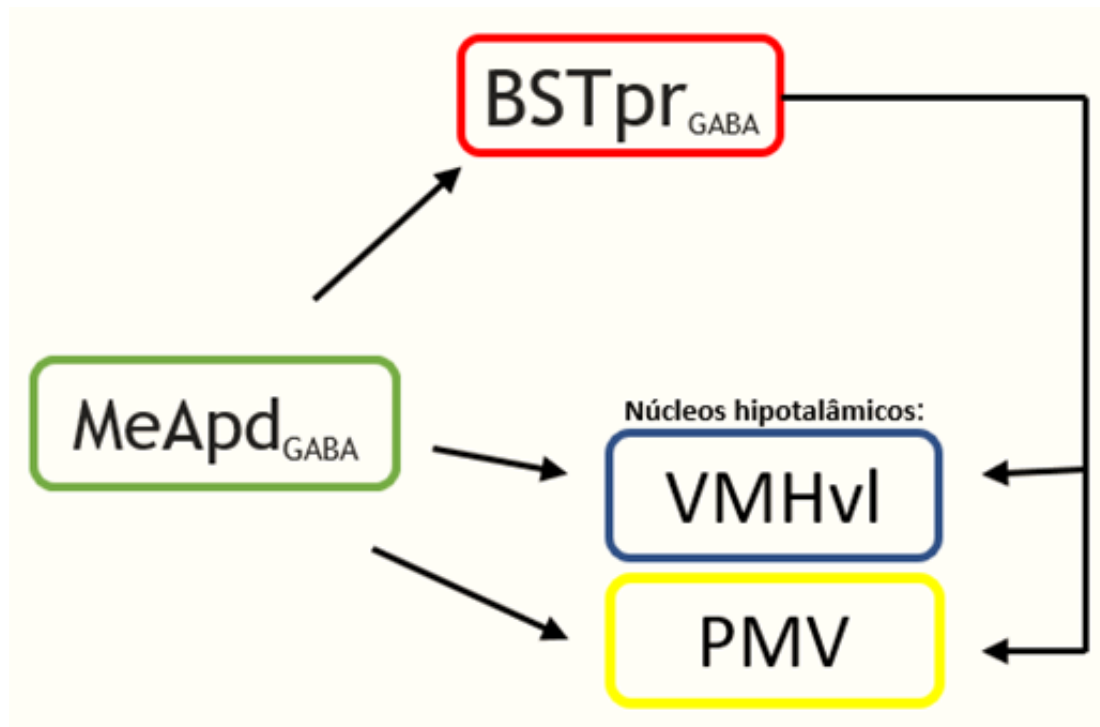
#### **1.4 Neurônios gabaérgicos do MeA**

O MeA é um núcleo amigdalár composto predominantemente por neurônios inibitórios gabaérgicos (~70%) (Bian, 2013; Li e col., 2017; Keshavarzi e col., 2014). Como dito anteriormente, esse núcleo está conectado com regiões do hipotálamo responsável pelos comportamentos sociais e defensivos (Motta e col., 2009; Motta e col., 2013; Westberry e Meredith, 2017). No entanto, esses alvos hipotalâmicos estão ativados durante o comportamento de defesa social (Motta e col., 2009) e não inibidos como seria possível esperar de alvos de um núcleo gabaérgico após sua ativação. Um possível caminho para a ativação do MeA levar a ativação desses núcleos seria através de uma conexão intermediária com o núcleo intersticial da estria terminal, porção principal (BSTpr), que também é gabaérgico e se projeta para os mesmos alvos hipotalâmicos que o MeA (Dong, e col., 2004), com isso, o BSTpr poderia manter uma inibição tônica nos núcleos hipotalâmicos sexualmente dimórficos. Dessa forma, quando o BSTpr fosse inibido pelo MeA durante a exposição a um coespecífico dominante, esse deixaria de inibir os núcleos hipotalâmicos que seriam ativados para organização do comportamento em questão. A Figura 2 traz um esquema das projeções existentes entre as regiões envolvidas na defesa social.

Estudos apontaram a importância dos neurônios gabaérgico em comportamentos sociais (Zhang e col., 2014), nas reações defensivas em roedores (Choi e col., 2005), e na modulação de medos inatos e aprendidos (Makkar e col., 2010; Bergado-Acosta e col., 2008; Fujihara e col., 2020), além disso, disfunções gabaérgicas estão relacionadas em humanos com distúrbios

neuropsiquiátricos como depressão (Shur e col., 2016; Gabbay e col., 2017), esquizofrenia (Tsubomoto e col., 2019), ansiedade e pânico (Long e col., 2013; Muller e Stork, 2015). No entanto, ainda não é completamente compreendido o papel dos neurônios gabaérgicos na organização e modulação de comportamentos defensivos.

Figura 2 - Esquema demonstrando as conexões entre os núcleos envolvidos na derrota social.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021. Abreviaturas: ver lista.

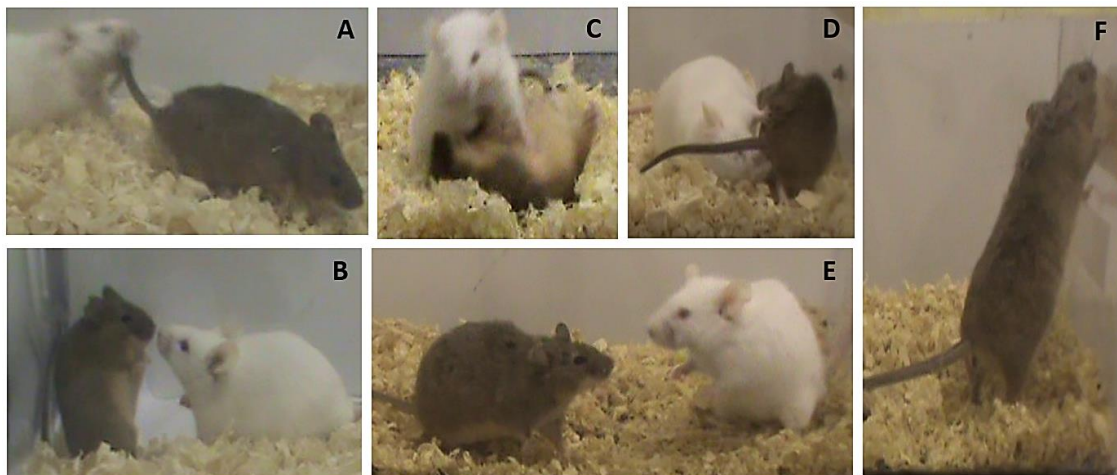
### 1.5 Modelos de estudo animal

Um modelo experimental proposto para estudar situações de ameaça e defesa social, é o paradigma residente-intruso (Miczek, 1979; Koolaas e col., 2013), que se baseia na territorialidade inata dos animais, colocando os indivíduos diante de um encontro agonístico, onde, para estabelecer a dominância, um macho é mantido em gaiola moradia com uma fêmea sexualmente receptiva por determinado período. Esse modelo experimental permite a observação da interação e dos comportamentos sociais, ofensivos do residente e defensivos do intruso (Figura 3).

Os comportamentos padrões dos indivíduos são distintos, o animal residente apresenta comportamentos de ataques e agressão a um intruso,

envolvendo aproximação, cheirar o intruso, ataques laterais, mordidas e perseguições, que podem se tornar menos frequentes e intensos diante da imobilização do intruso ou ao longo do tempo (Blanchard e Blanchard, 1977; Simon e Gandelman, 1981).

Figura 3 – Comportamentos agonístico de camundongos em um conflito social



Comportamentos de camundongos residentes (albino, linhagem Swiss) e intrusos (marrom, linhagem transgênica VgatFlox) no teste Paradigma Residente-Intruso. A- o residente morde o intruso em fuga (*flight*); B- o residente ameaça o intruso que mantém uma postura ereta defensiva (*Upright*); C- o residente ataca e se mantém sobre o intruso, deitado com as costas em contato com o solo (*On the back*); D- ambos fazem reconhecimento, investigando a região anogenital; E- residente ameaça o intruso imobilizado em congelamento (*freezing*); F- intruso explora o ambiente do residente. Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

O animal intruso expressa comportamentos de defesa, que podem ser classificados como defesa ativa ou passiva, sendo a primeira subdivida principalmente em evitação, *boxing*, postura elevada (*upright*), fuga e, a segunda, se subdividindo em manter-se sobre as costas (*on-the-back*), congelamento (*freezing*, Blanchard e col., 1977; Miczek, 1979; Motta e col., 2009; Koolhaas e col., 2013). Outros comportamentos, menos frequentes, incluem ataques defensivos, comportamentos exploratórios e de investigação social (Blanchard e col. 1977; Miczek, 1979; Motta e col., 2009; Koolhaas e col., 2013).

Protocolos baseados no paradigma residente-intruso têm sido amplamente usados em estudos de transtornos afetivos e psicossociais usando roedores. A derrota social crônica ou aguda resultam em síndromes semelhantes a depressão e ansiedade em humanos, com evitação nas interações sociais, mudanças comportamentais e fisiológicas próprias da condição patológica

(Golden e col., 2011; Hodes e col., 2014; Hammels e col., 2015; Chen e Hong, 2018; Patel e col., 2019). Transtornos neuropsiquiátricos relacionadas com agressão tem seguido esse protocolo com adaptações como estratégia em modelos de estudo usando residentes violentos como animal experimental (Koolhaas e col., 2013; Aleyasin e col., 2018; Hong e col., 2014). Esses estudos ampliam a compreensão dos mecanismos neurobiológicos relacionados a esses transtornos auxiliando assim o desenvolvimento de novas terapias, e na identificação de potenciais alvos de tratamentos.

Em nosso trabalho utilizamos o paradigma residente-intruso em derrota social aguda, testando a hipótese de que os neurônios gabaérgicos do MeA desempenham função primordial na organização de comportamentos de defesa social.

## **1.6 Objetivos**

O objetivo geral do nosso trabalho é estudar as projeções gabaérgicas do MeA na modulação da defesa social. Para isto estipulamos como objetivos específicos:

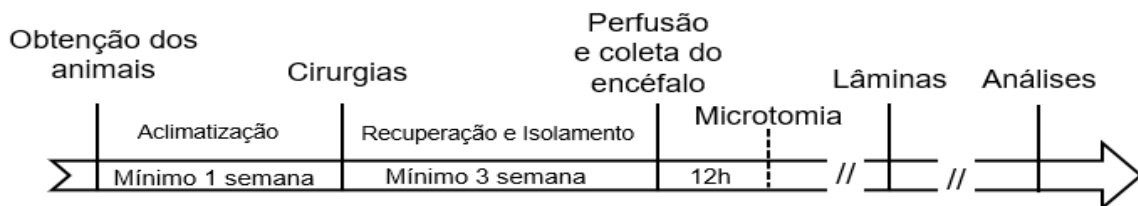
- a) Estudar anatomicamente as projeções gabaérgicas do MeA e identificar os núcleos que estão conectados a este com projeções eferentes inibitórias;
- b) Investigar a função dos neurônios gabaérgicos do MeApd na organização do comportamento defensivo frente ao coespecífico.

## 2 METODOLOGIAS

### 2.1 Desenho experimental - Estudo das eferências gabaérgicas do MeA (Experimento 1)

Utilizamos camundongos transgênicos machos e fêmeas da linhagem  $Vgat^{CRE}$  (Biotério do Departamento de Anatomia) que expressam a enzima recombinase Cre em neurônios gabaérgicos. Esses animais foram transfectados no MeA anterior e posterior (MeApd e MeApv), em cirurgia estereotáxica com o vírus anterógrado *AAV5.Ef1a-DIO.hCHR2(H134R)EYFP* ou *AAV5.EF1a-DIO.eNPHR3.0-EYFP*. Com isso é possível estudar as projeções gabaérgicas eferentes do MeA anterior e posterior. Esses animais foram perfundidos e seu encéfalo coletado, no mínimo 21 dias após a cirurgia estereotáxica. Na Figura 4 apresentamos o delineamento experimental esquematizado.

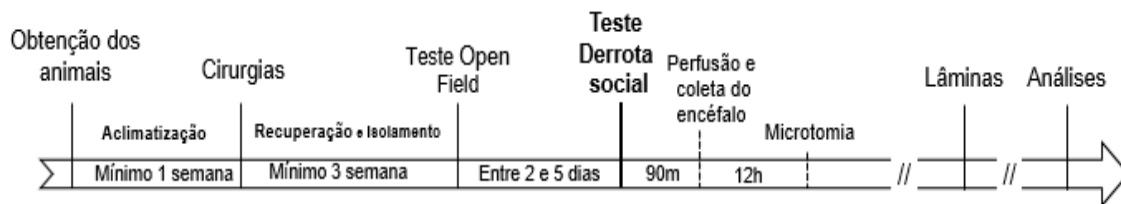
Figura 4 - Esquema do delineamento experimental 1



### 2.2 Desenho experimental - Retirada do GABA como neurotransmissor de neurônios do MeA (Experimento 2)

Camundongos machos (linhagem  $Vgat^{Fllox}$  - Biotério do Departamento de Anatomia) com idade entre 10 e 20 semanas, foram transfectados no MeApd com o vírus *AAV5-CMV-CRE-GFP* ou *AAV5.hSyn.EYFP-pA*, de acordo com o grupo, experimental ou controle respectivamente. Os animais foram submetidos ao teste de campo aberto, para avaliação de atividade motora, e em um segundo dia, ao teste paradigma residente- intruso. No dia do teste defensivo esses animais foram, então, colocados na caixa do camundongo dominante (linhagem Swiss). Os animais foram perfundidos e o encéfalo coletado 90 minutos após o fim dos testes, para microtomia e análises posteriores. Os testes de defesa social foram filmados e analisados no *Behavioral Observation Research Interactive Software (BORIS)*. Na Figura 5 apresentamos o delineamento experimental esquematizado.

Figura 5 - Esquema do delineamento experimental 2



### 2.3 Animais e vírus utilizados

Todos os animais usados nos experimentos foram mantidos em condições estáveis (temperatura, fotoperíodo, umidade relativa do ar) e com água e ração comercial à vontade, exceto durante os testes comportamentais. Os procedimentos experimentais estão de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sendo conduzidos de acordo com as normas e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB - USP (nº 58/2016).

### 2.4 Cirurgia estereotáxica para injeção viral

Para a injeção dos vetores virais, os animais foram mantidos anestesiados com Isoflurano, via inalatória e aquecidos em 37°C em cama cirúrgica. Logo após, estes animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico e receberam entre 0,015 e 0,05 µl do vírus adenoassociados de acordo com o experimento em questão (Quadro 1), através de uma seringa Hamilton (0,5 µl), utilizando bomba de infusão digital (*Harvad Apparatus*) programada entre 0,003 e 0,005 µl/min.

As coordenadas cirúrgicas para atingir as regiões de interesse, foram ajustadas seguindo as coordenadas do atlas estereotáxico para camundongos - *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Franklin e Paxinos, 2012).

O critério de inclusão no estudo anatômico (Experimento 1), ficou estabelecido pela infecção viral centradas inclusivamente nas porções anterior, posterodorsal e posteroventral observadas pela fluorescência repórter do vírus, e principalmente na marcação do local de injeção na imuno-histoquímica. Foram excluídos os animais que a injeção abarcava regiões adjacentes a mencionadas, as de grande área marcada em imuno-histoquímica e que as que não foram observados a fluorescência repórter do vírus.



No estudo funcional (Experimento 2), foram considerados como critério de inclusão dos animais nos grupos experimentais e controle a fluorescência repórter do vírus e infecção viral bilateralmente no MeA, com rastro, ou maior concentração de infecção na porção posterodorsal e, foram excluídos os animais com maior concentração viral em outras porções, com infecção unilateral no MeA, ou baixa infecção no núcleo de interesse, indicado pela pouca fluorescência, também foram excluídos os animais que tiveram encontros agonísticos com residente em desacordo com os perfis estabelecidos para o paradigma residente-intruso, como por exemplo, um residente que não atacou durante os 5 minutos de teste (não agressivo), ou muito agressivo sendo necessário excluir das análises ou retirar o intruso antes tempo determinado.

Quadro 1 – Experimentos, animais e vírus

	<b>Animais (Linhagem)</b>	<b>Vírus adenoassociado</b>	<b>Volume injetado</b>
<b>Estudo Anatômico</b>	Macho Vgat <sup>CRE</sup>	<i>AAV5.Ef1a-DIO.hCHR2(H134R)EYFP</i>  <i>e</i> <i>AAV5.EF1a-DIO.eNPHR3.0-EYFP</i>	15nl
	Fêmea Vgat <sup>CRE</sup>		
<b>Estudo Funcional</b>	Macho VGat <sup>Flox</sup>	<i>AAV5-CMV-CRE-GFP</i>	50nl
		<i>AAV5.hSyn.EYFP-pA</i>	35nl

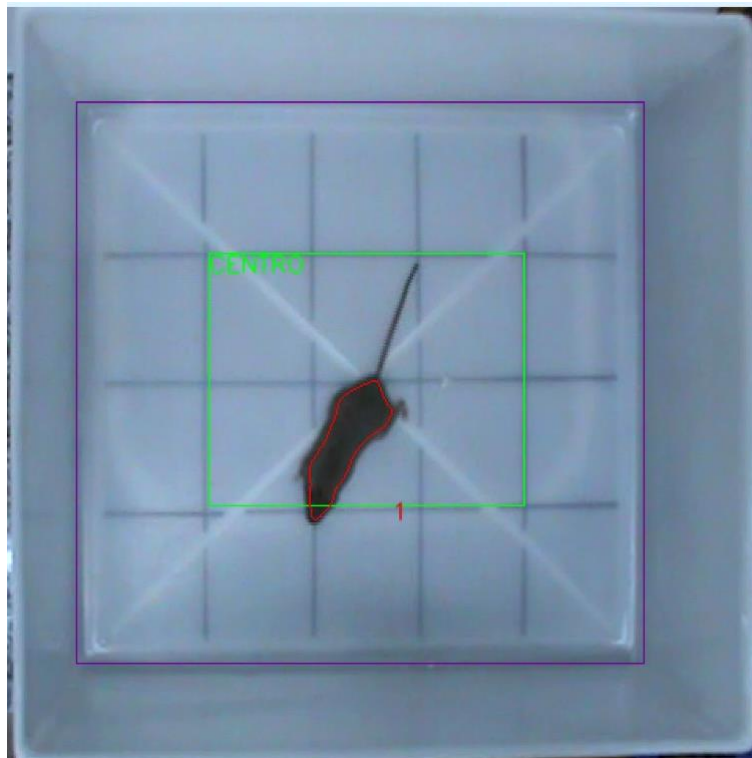
## 2.5 Protocolos Experimentais

### 2.5.1 Teste de Campo aberto

Para avaliar se a ablação genética do transportador vesicular do GABA no MeA levou a algum impacto na atividade locomotora, os animais do experimento 2 foram submetidos ao teste de campo aberto, com no mínimo 21 dias após a infecção viral. No dia do teste os animais foram retirados de sua gaiola moradia e colocados no centro do aparato de teste campo aberto, onde permaneceram por 5 minutos para livre deslocamento, os testes foram filmados com a câmera posicionada em vista superior. O aparato de teste mede 38 x 30 x 16 (comprimento x largura x altura), e possui marcações quadriculares para

demarcar regiões periféricas e central, possibilitando reconhecer as regiões de preferência e de permanência. As análises foram feitas no programa *Detection of Object and Tracking (DORIS)*. Friard, 2020) e analisamos a distância percorrida e o tempo de permanência nas regiões. Para esse teste, delimitamos 2 regiões: centro e periferia, que abarca as laterais próximas as paredes da caixa (Figura 6).

Figura 6 – Arena do teste de campo aberto



Arena de realização do teste de campo aberto. Em verde, as limitações da região Centro, com a presença de um animal experimental identificado (em vermelho) pelo programa de rastreamento *DORIS*. Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

### 2.5.2 Teste comportamental: Paradigma Residente-Intruso

Os animais do experimento 2, foram submetidos ao estresse de derrota social aguda no teste Paradigma Residente-Intruso (Miczek, 1979) entre 2 ou 5 dias após o teste de campo aberto. Nos testes de derrota social, usamos camundongos dominantes (residentes da linhagem Swiss - Biotério central do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP), com territorialidade estabelecida. No dia do teste comportamental, as fêmeas residentes foram retiradas da gaiola moradia pouco antes do teste. O intruso foi colocado na gaiola moradia do residente e o teste teve duração de 5 minutos a partir do primeiro ataque do residente.

Os testes foram filmados e posteriormente analisados no *Behavioral Observation Research Interactive Software (BORIS)*. Friard e Gamba, 2016). Foram avaliados os comportamentos defensivos, sociais e exploratórios do intruso. No Quadro 2 estão descritos os comportamentos observados e a categoria pertencente.

Quadro 2 – Comportamentos do intruso analisados

<b>Categorias</b>	<b>Comportamentos</b>	<b>Descrição</b>
<b>Defesa ativa</b>	<i>Upright</i>	Postura ereta nos membros traseiros com orientação para o oponente
	<i>Fuga</i>	Afastar-se de um adversário que se aproxima, e ou em perseguição
	<i>Boxing</i>	Postura ereta nos membros traseiros, e dianteiros a boxear o oponente
	<i>Roll tumble</i>	Os animais rolam juntos durante a fuga, e ataques, invertendo as posições
<b>Defesa passiva</b>	<i>On the back</i>	Com as costas em contato com o solo, enquanto o oponente fica sobre o animal. Postura de submissão completa
	Congelamento	O animal entra em completo congelamento motor, somente interrompido por pequenas movimentações do pescoço.
<b>Exploração</b>	Cheirar o ambiente	O animal anda ou mantém-se parado dentro do aparato, cheirando o ambiente ao seu redor; o animal se eleva nas patas traseiras, tocando o aparato com as dianteiras, também cheirando o ambiente ao redor.
	Procurar saída	
<b>Social</b>	Investigação direta	Cheirar o residente e, ou a região anogenital do residente
<b>Agressão</b>	Agressão/ Perseguição	Comportamento de ataque ao residente, indicando sinal de busca de dominância.
<b>Outros</b>	Autocuidado	Consisti em limpeza facial e limpeza corporal ( <i>grooming</i> )
	Comendo	O animal roe material (alimento ou não), que encontra na moradia do residente
<b>Mordidas</b>	Dadas	Mordidas de retaliação que o intruso dá no residente
	Recebidas	Mordidas de ataque do residente no intruso

Fonte: Adaptado de Blanchard e col. 1977; Miczek, 1979; Motta e col., 2009

## 2.6 Perfusão

Os animais foram anestesiados por via inalatória com isoflurano e perfundidos por via transcardíaca, utilizando uma bomba peristáltica (*Cole Parmer*), 90 minutos após os testes comportamentais (tempo de maior expressão de ativação de Fos, indicativo de ativação neuronal). As perfusões foram feitas inicialmente com 25 ml de uma solução salina 0,9%, seguida de aproximadamente 130 ml de uma solução fixadora de formaldeído a 4% diluído em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4). Os encéfalos foram, então, retirados das caixas cranianas e mantidos por aproximadamente 4 horas na mesma solução fixadora, posteriormente transferido para solução de sacarose 20% em tampão fosfato de potássio 0,02M, *overnight* (12h).

## 2.7 Microtomia

Cortes frontais seriados, com 40 µm de espessura, foram obtidos utilizando-se um micrótomo de congelação (*Reicher-Young*). Os cortes foram colhidos sequencialmente em 4 compartimentos, de forma que a distância entre os cortes num mesmo compartimento é de 160 µm. Esses cortes foram mantidos em solução *antifreeze* contendo 15% de sacarose, tampão fosfato de sódio 0,05M e 30% de etilenoglicol em freezer -20°C.

Os cortes de encéfalo de um dos compartimentos foram imunorreagidos, e uma série de cortes adjacentes foram corada pelo método de Nissl, com tionina 0,25% como corante, para servirem como referência citoarquitetônica.

## 2.8 Imuno-histoquímica

No processamento imuno-histoquímica para amplificação dos sinais de GFP ou marcação da proteína Fos, os cortes foram incubados inicialmente em uma solução de tampão fosfato de potássio 0,02M contendo triton X-100 a 0,3%, soro normal de cabra a 2% e anticorpo de interesse (anti-GFP ou anti-cFos) (Quadro 3), sob agitação constante, a 4°C, durante 72 horas.

O complexo antígeno-anticorpo foram localizado utilizando-se uma variação do sistema formado pelo complexo avidina-biotina (ABC) (Hsu e Raine, 1981). Assim, após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram

incubados em uma solução contendo anticorpo biotinilado anti-IGg de coelho, feito em cabra (*Vector Laboratories*), numa diluição de 1:200, em temperatura ambiente, por 1 hora e 30 minutos e em seguida, foram colocados em uma solução contendo o composto avidina-biotina-HRP (ABC Elite Kit, *Vector Laboratories*) numa diluição de 1:200, por 1 hora e 30 minutos. Na reação da imunoperoxidase, para a revelação do complexo antígeno-anticorpo utilizamos basicamente o protocolo de Itoh e cols. (1979).

Resumidamente, os cortes foram incubados em uma solução de tampão fosfato de sódio 0,1M contendo 50 mg de tetrahidrocloreto de 3-3' diaminobenzidina-DAB (*Sigma*), 2 ml de uma solução aquosa de sulfato de níquel a 10% e 40 mg de cloreto de amônia em 100 ml, por 5 minutos, na sequência, foram adicionado  $\beta$ -D-glicose (*Sigma*) e interrompemos a reação após um período variável. Os cortes foram então montados em lâminas recobertas com gelatina. Em seguida os cortes foram desidratados e recobertos com DPX (*Aldrich Chemical Co.*).

Quadro 3 - Concentração dos Anticorpos durante a incubação no processamento de imuno-histoquímica

Proteína	Anticorpo primário				Anticorpo secundário			
	Anticorpo	Feito em:	Concentração usada:	Marca	Anticorpo	Feito em:	Concentração usada:	Marca
cFos	anti-cFos (PC38)	Coelho	1:20.000	<i>Calbiochem</i>	Biotinilado anti-IGg de coelho	Cabra	1:200	<i>Vector Laboratories</i>
GFP	Anti-GFP	Coelho	1:30000 1:50000	<i>Oncogene Research Products</i>				

## 2.9 Análise das Imagens

As lâminas de cortes histológicos foram observadas e fotografadas utilizando microscópio de fluorescência, com filtro verde, para verificação da fluorescência repórter do vírus e local de infecção. Já as lâminas imunomarcadas foram observadas e fotografadas sob microscopia de luz com objetivas de aumento de 4x, 10x, 20x e 40x (experimento 1: projeções do MA), e objetiva de 10X para cortes imunorreagidos para Fos (Experimento 2, estudo funcional).

Utilizamos Microscópio *Nikon Eclipse 80i* (*Nikon Corporation, Chiyoda-Ku, Tokyo-To, Japan*) e câmera digital *Nikon DXM1200F* (*Nikon Corporation*)

anexada ao microscópio com o *software ImageJ (Image processing and analysis in Java)* para captura das imagens. As imagens obtidas foram tratadas e editadas utilizando *Photoshop (Adobe Systems Incorporated)*.

## **2.10 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no *BioEstat 5.3* (Ayres, e col., 2007), os dados foram testados quanto a distribuição de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Nas amostras com resultados não satisfatórias no teste de normalidade utilizamos o teste não paramétrico de Mann Whitney, e para as amostras que apresentavam uma distribuição normal, o teste T (*Student Test*) não-pareado. O tamanho amostral se baseia em dados amostrais de trabalhos anteriores na área.

Os dados estão apresentados com média  $\pm$  epm, e assumiu-se nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ) em todos os testes de confiança.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Resultados Experimento 1

Os animais (n=76, dos quais 44 eram fêmeas e 32 machos) que foram transfectados nas porções posterodorsal, posteroventral e anterior do MeA com o vírus anterógrado *AAV5.Ef1a-DIO.hCHR2(H134R)EYFP* ou *AAV5.EF1a-DIO.eNPHR3.0-EYFP* unilateralmente, com 15 nl. Os encéfalos foram coletados após a perfusão, com no mínimo 21 dias pós a cirurgia estereotáxica. Foram realizados ensaios de imuno-histoquímica para amplificação do sinal da marcação de GFP e nissl para identificação citoarquitetônica.

##### 3.1.1 Cirurgia estereotáxica

As injeções ficaram confinadas nas porções, anterior (Figura 7, A), posterodorsal rostral (Figura 8, B), posterodorsal caudal (Figura 9, A) e posteroventral (Figura 11, A) do MeA conforme descrito na Quadro 4. Outras injeções abrangeram porções anterior e posterior, mas não foram inclusas pois o volume injetado era maior que 0,015 µl e apresentavam contaminação de regiões adjacentes do MeA.

Neste trabalho focamos em mostrar principalmente as projeções eferentes gabaérgicas do MeA observadas para regiões relacionadas com o circuito de defesa social (BST, VMH, PMV), outras projeções foram observadas e serão discutido em trabalhos futuros.

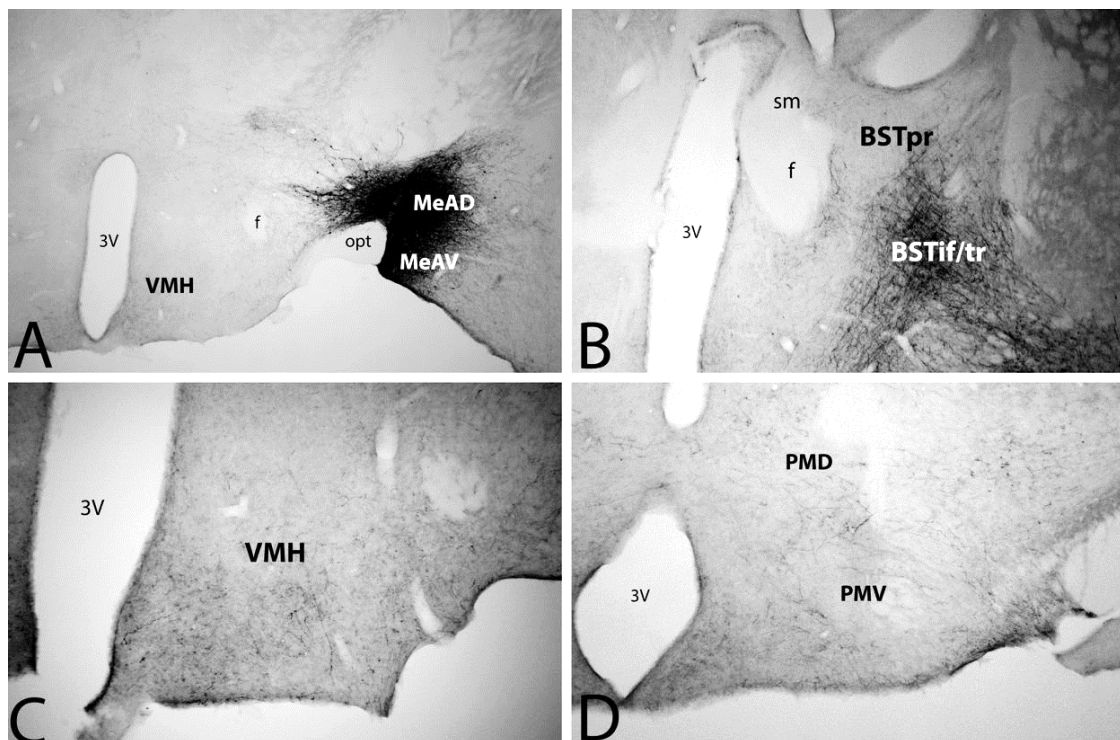
Quadro 4 - Local das injeções de rastreamento das projeções eferentes gabaérgicas

<b>Caso</b>	<b>Local da injeção</b>
VgatMacho25	MeA anterior
VgatMacho12;	MeA posterodorsal, rostral
VgatMacho26	MeA posterodorsal, rostral
VgatMacho27	MeA posterodorsal, caudal
VgatMacho28	MeA posterodorsal, caudal
VgatMacho29	MeA posterodorsal, caudal
VgatFemêa37	MeA posterodorsal, caudal
VgatFemêa39	MeA posterodorsal, caudal
VgatFemêa38	MeA posteroventral

### 3.1.2 Projeções eferentes gabaérgicas do MeAnterior

Para fim de demonstração, utilizamos o caso VgatMacho25 (Figura 7) que recebeu 15 nl da injeção de vírus no MeAad, incluindo parte do MeAav. Foram observadas projeções gabaérgicas anterógradas do MeA para o BSTif/tr (Figura 7, B), VMHvl e regiões adjacentes ao VMH (ARH, TU. Figura 7, C), e PMV (Figura 7, D).

Figura 7 - Fotomicrografia de cortes frontal de camundongo macho VgatCRE (caso vgatMacho25), que recebeu injeção do vírus *AAV5.EF1a-DIO.eNPHR3.0-EYFP* (15 nl) no MeAnterior



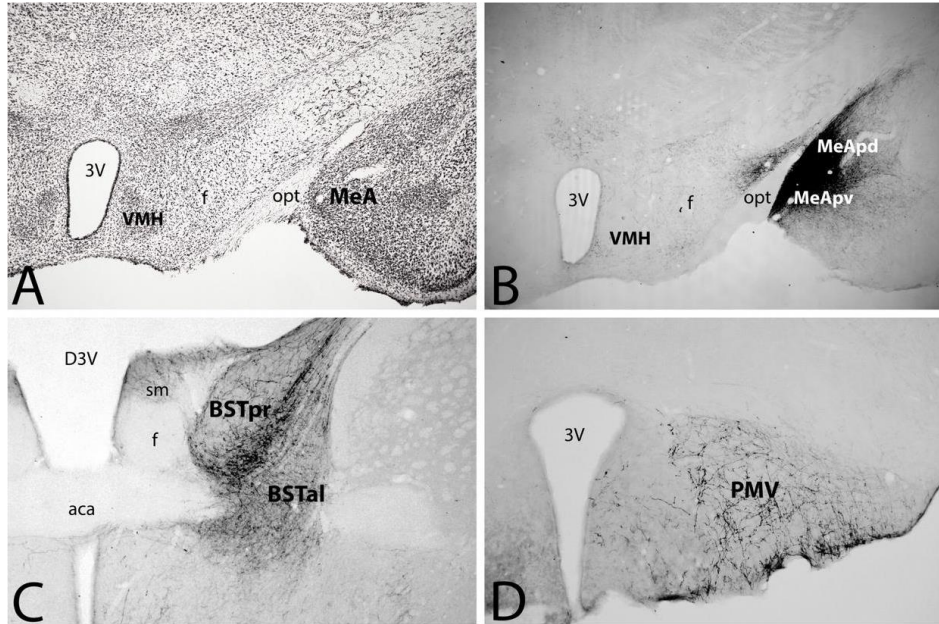
Cortes Imunorreagidos com anticorpo anti-GFP. **A-** Região do MeAnterior, local de injeção; **B-**, Região do BST, com projeções; **C-** Região do VMH, com projeções; **D-** Região do PMV, com projeções. Abreviaturas: ver lista.

### 3.1.3 Projeções eferentes gabaérgicas do MeApd

Utilizamos o caso VgatMacho26 (Figura 8) para demonstrar as projeções gabaérgicas anterógradas do MeApd rostral, e o caso Vgatmacho27 (Figura 9) MeApd caudal. Foram observadas projeções para regiões adjacentes do VMH e TU (Figura 8, B; Figura 9, C), BSTpr e MPN (Figura 8, C; Figura 9, B) e PMV (Figura 8, D; Figura 9, D).

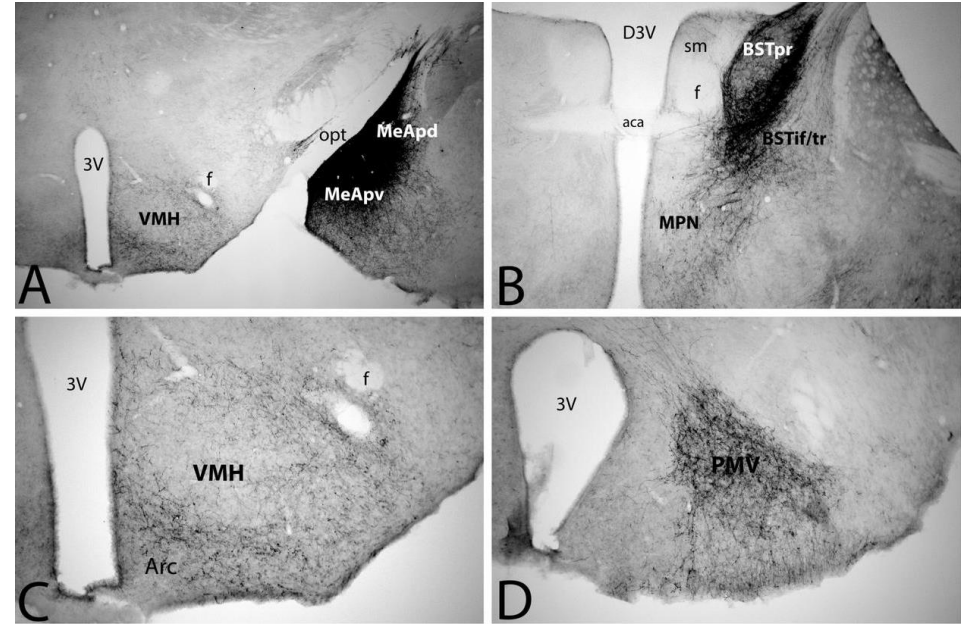


Figura 8 - Fotomicrografia de cortes frontal de camundongo macho VgatCRE (caso VgatMacho26), que recebeu injeção do vírus AAV5.EF1a-DIO.eNPHR3.0-EYFP (15 nl) no MeApd rostral



Corte corado com Nissl, região do MeA (A) e cortes imunorreagidos com anticorpo anti-GFP (B-D). B- Região do MeApd rostral (local de injeção) e VMH; C- Região do BST, com projeções; D- Região do PMV, com projeções. Abreviaturas: ver lista.

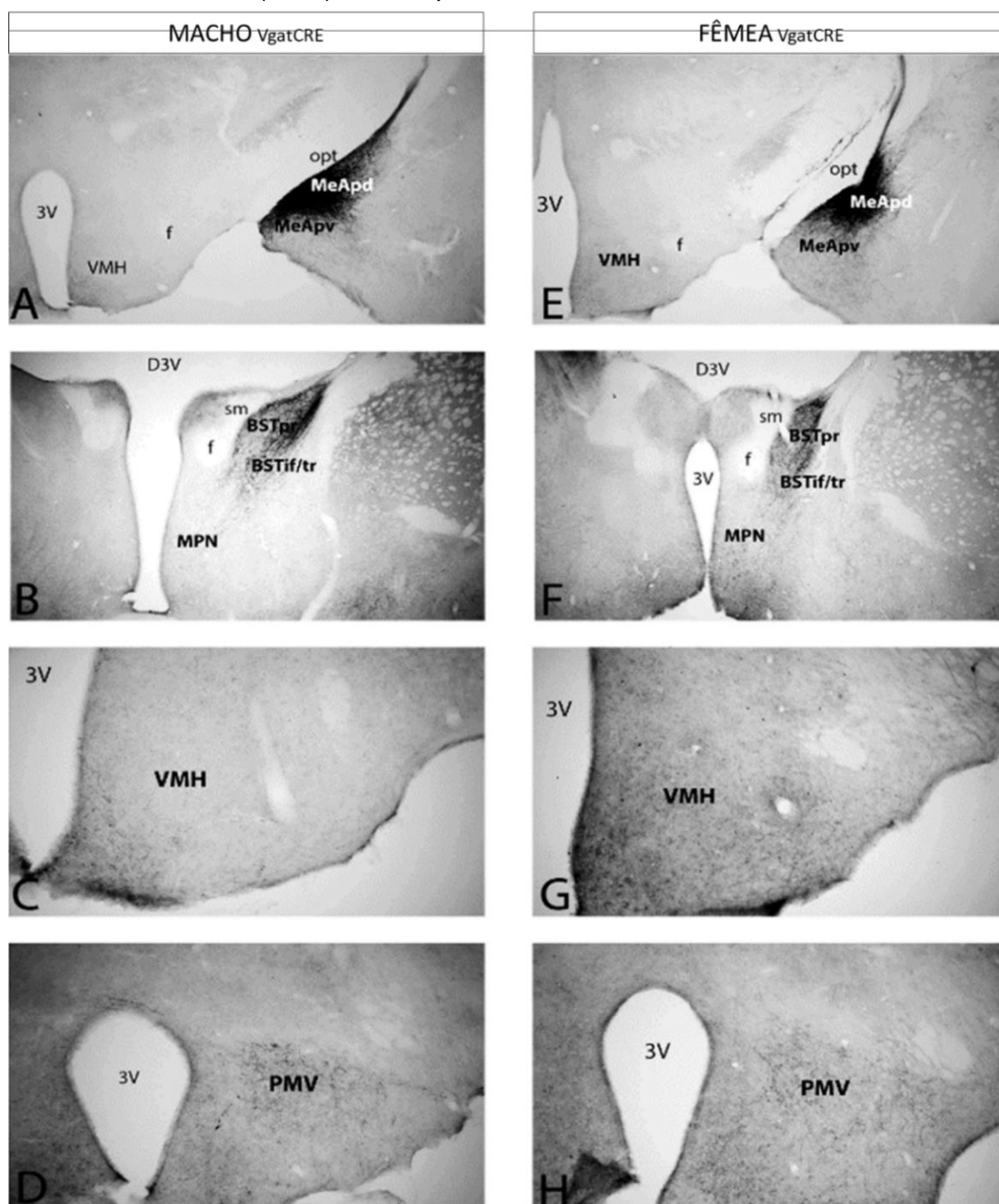
Figura 9 - Fotomicrografia de cortes frontal de camundongo macho Vgat<sup>CRE</sup> (caso Vgatmacho27), que recebeu injeção do vírus AAV5.EF1a-DIO.eNPHR3.0-EYFP (15 nl) no MeApd caudal.



Cortes Imunorreagidos com anticorpo anti-GFP. A- Região do MeApd caudal, local de injeção; B- Região do BST, com projeções; C- Região do VMH, com projeções; D- Região do PMV, com projeções. Abreviaturas: ver lista.

O caso *Vgatmacho29* foi utilizado para demonstrar as projeções gabaérgicas anterógradas do MeApd em machos, e o caso *Vgatfêmea37* para demonstrar as projeções gabaérgicas anterógradas do MeApd em fêmeas, a fim de comparar e demonstrar que as mesmas projeções estão presentes em machos e fêmeas (Figura 10). Foram observadas projeções para o BSTpr (Figura 10, B e F), regiões adjacentes do VMH (Figura 10, C e G), e PMV (Figura 10, D e H).

Figura 10 - Fotomicrografia de cortes frontal de camundongo macho e fêmea *VgatCRE* (casos *Vgatmacho29* e *Vgatfêmea37*), que receberam injeção do vírus *AAV5.EF1a-DIO.eNPHR3.0-EYFP* (15 nl) no MeApd

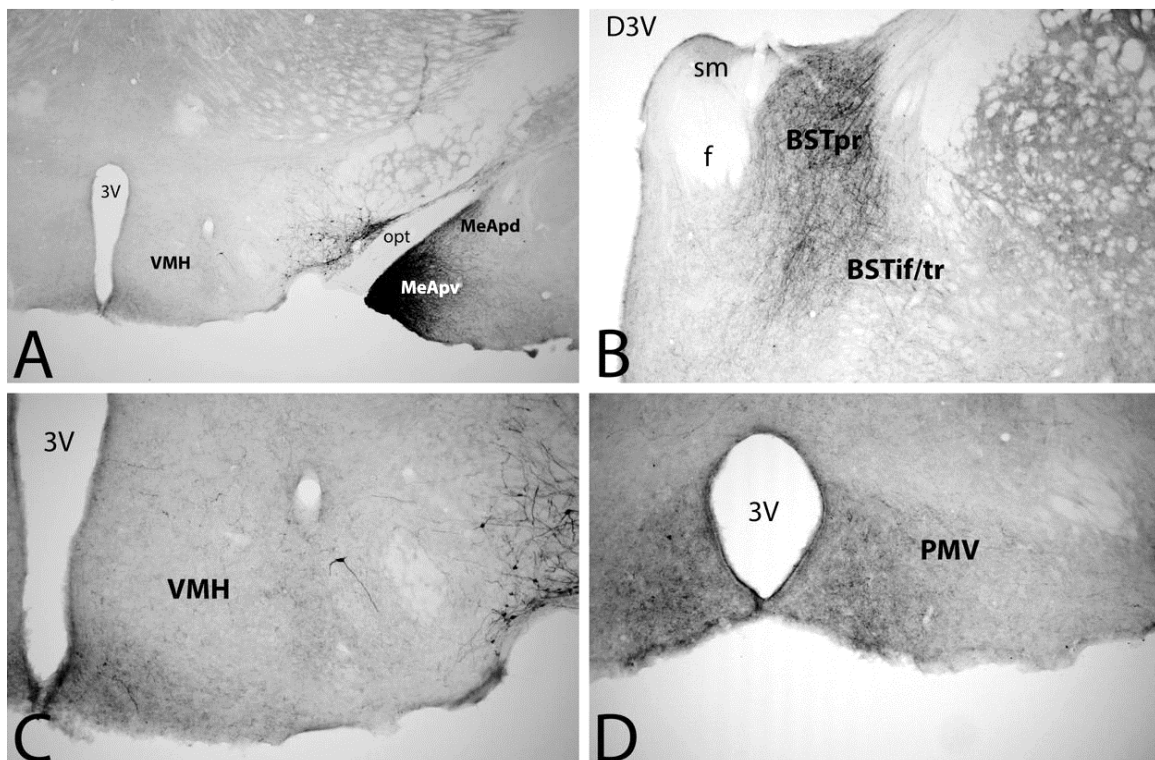


Cortes imunorreagidos com anticorpo anti-GFP. **A e E** - Região do MeApd, local de injeção; **B e F** - Região do BST, com projeções; **C e G** - Região do VMH, com projeções adjacentes; **D e H** - Região do PMV, com projeções. Abreviaturas: ver lista.

### 3.1.4 Projeções eferentes gabaérgicas do MeApv

Utilizamos o caso VgatFêmea38 (Figura 11) para demonstrar as projeções gabaérgicas anterógradas do MeApv. Foram observadas principalmente projeções para regiões do BST (Figura 11, B) e regiões adjacentes do VMH (Figura 11, C).

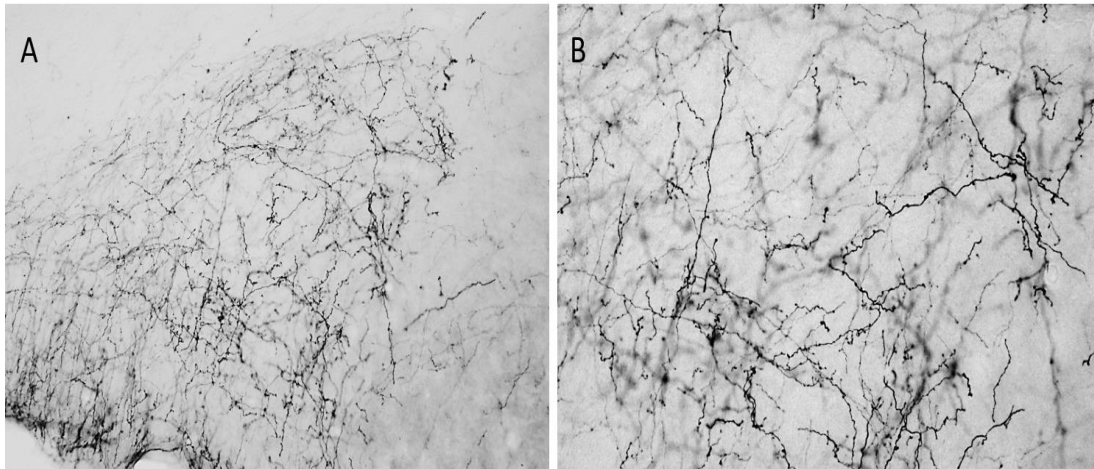
Figura 11- Fotomicrografia de cortes frontal de camundongo fêmea Vgat<sup>CRE</sup> (caso VgatFêmea38), que recebeu injeção do vírus AAV5.EF1a-DIO.eNPHR3.0-EYFP (15 nl) no MeApv.



Cortes Imunorreagidos com anticorpo anti-GFP. **A-** Região do MeApv, local de injeção; **B-** Região do BST, com projeções; **C-** Região do VMH, com projeções adjacentes; **F-** Região do PMV, sem projeções. Abreviaturas: ver lista.

Em todas as projeções descritas acima, foram observados botões terminais. Em destaque na Figura 12, a região do PMV do caso VgatMacho12 em aumento de 20x (A) e 40x (B). Não foram consideradas as densidades das projeções para as comparações entre macho e fêmea, ou com os casos descritos na literatura, pois existem variações no tamanho da infecção e no número de células contaminadas que não foram contabilizados.

Figura 12 - Fotomicrografia de cortes frontal de camundongo macho  $Vgat^{CRE}$  (caso  $Vgat12macho$ ), imunorreagido com anticorpo (anti-GFP) que recebeu injeção do vírus  $AAV5.Ef1a-DIO.hCHR2(H134R)EYFP$  (15nl) no MeApd



Em destaque de 20x (A) e 40x (B) a região do PMV

### 3.2 Resultados experimento 2

Neste experimento, utilizamos animais  $Vgat^{Flox}$  que apresentam o gene do transportador vesicular do GABA flanqueado, assim, na presença da enzima Cre, neurônios gabaérgicos se mantem vivos e funcionantes, mas não liberam GABA na fenda sináptica. Dessa forma, animais  $Vgat^{Flox}$  foram separados em grupo controle (n=8), transfectados bilateralmente no MeApd com o vírus  $AAV5.hSyn.EYFP-pA$  e grupo experimental (n=8) transfectados bilateralmente no mesmo núcleo com o vírus  $AAV5-CMV-CRE-GFP$  (Figura 13), que conforme explicação anterior, deixam de liberar o neurotransmissor GABA na fenda sináptica.

#### 3.2.1 Teste de campo aberto

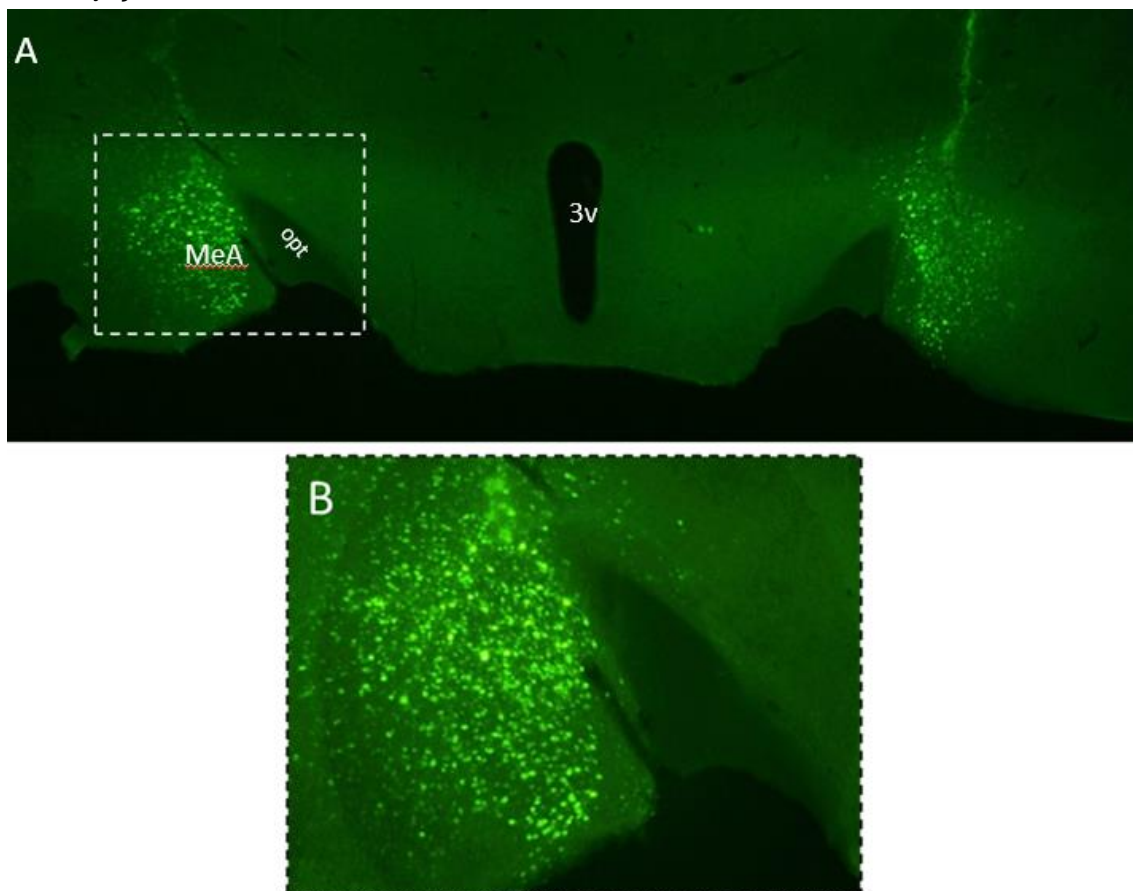
As análises estatísticas dos resultados do teste de campo aberto, que mostra a atividade locomotora nos animais, não encontraram diferenças entres os grupos controle e experimental (Tabela 1).

Tabela 1 -Resultado do teste de campo aberto

	Controle	Experimental	Valor de p
Distância percorrida (m)	18,25 ± 1,228	16,625 ± 2,052	0,4964
Permanência centro (s)	58,371 ± 10,257	35,317 ± 5,499	0,0863

Dados estatístico (Teste T) que foram quantificados no programa Detection of Object and Tracking para os grupos Controle (n = 7) e Experimental (n = 6), do intruso em exposição de 5 minutos no Teste de campo aberto.

Figura 13 - Fotomicrografia de cortes frontal de camundongos  $Vgat^{Flx}$  (caso  $VgatFlx28$ ) com injeção bilateral do vírus AAV5-CMV-CRE-GFP no MeA.



Cortes mostrando a fluorescência repórter do vírus. **A**- Montagem de fotomicrografias mostrando a infecção bilateral na região do MeA, local de injeção; **B**- Em destaque, com aumento (10x) a região do MeA, lado esquerdo.

### 3.2.2 Teste comportamental

Os dados obtidos nas análises comportamentais no paradigma residente-intruso estão apresentados na Tabela 2. Foram observados principalmente mudanças comportamentais de exploração, defesa total, defesa passiva e social no grupo experimental quando comparado com os animais controles, sendo que o grupo Experimental expressou menos comportamentos de defesa passiva e defesa total e, maior exploração do ambiente e investigação do residente quando comparados ao grupo controle. Na Figura 14 estão apresentados os dados em médias dos comportamentos no grupo experimental e controle.

Tabela 2 – Dados comportamentais quantificados em tempo total de duração em segundos, e em quantidade total de mordidas dadas e recebidas em cada caso nos grupos Controle e Experimental

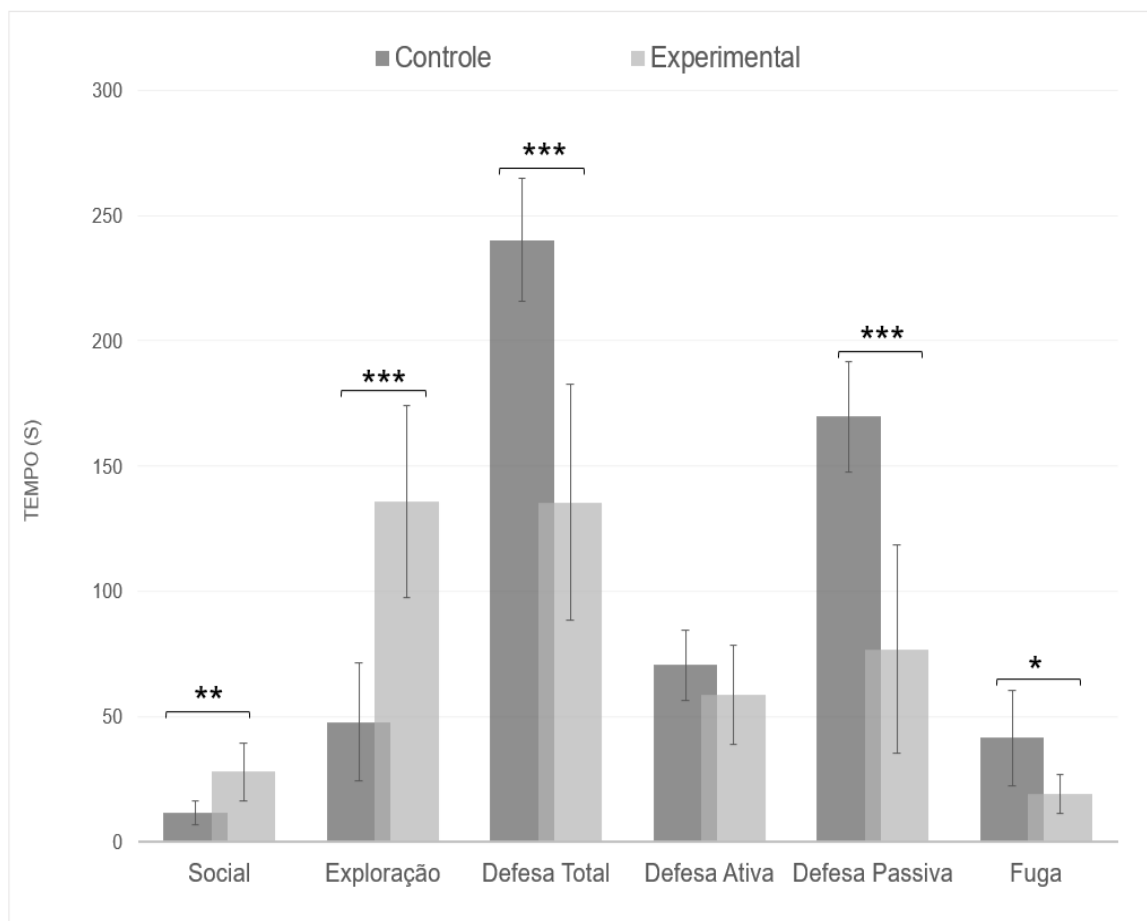
Grupo	Caso	Social (s)	Exploração (s)	Defesa (s)			Fuga* (s)	Outros (s)	Mordidas (qtd)	
				Ativa	Passiva	Total			Dadas	Recebidas
Controle	Vgat <sup>Flox</sup> C15	10,3	72,8	68,0	148,9	216,9	43,8	0,0	0	24
Controle	Vgat <sup>Flox</sup> C17	10,4	34,6	46,4	208,6	255,0	18,6	0,0	0	17
Controle	Vgat <sup>Flox</sup> C18	15,1	63,1	66,2	155,6	221,8	53,3	0,0	0	26
Controle	Vgat <sup>Flox</sup> C21	2,2	50,1	77,9	169,8	247,7	70,2	0,0	0	24
Controle	Vgat <sup>Flox</sup> C22	11,1	39,3	72,4	177,2	249,6	35,6	0,0	0	22
Controle	Vgat <sup>Flox</sup> C24	10,5	12,3	87,7	189,5	277,2	61,8	0,0	1	32
Controle	Vgat <sup>Flox</sup> C32	17,2	28,6	86,9	165,1	252,0	26,0	2,2	2	21
Controle	Vgat <sup>Flox</sup> C33	16,1	82,7	58,7	142,5	201,2	23,1	0,0	1	19
Experimental	Vgat <sup>Flox</sup> 2	26,8	148,0	31,1	94,1	125,2	14,9	0,0	2	15
Experimental	Vgat <sup>Flox</sup> 7	29,9	173,3	38,7	58,1	96,8	13,8	0,0	1	12
Experimental	Vgat <sup>Flox</sup> 11	48,8	162,0	74,9	14,3	89,2	17,9	0,0	2	25
Experimental	Vgat <sup>Flox</sup> 26	13,3	110,9	82,8	93,0	175,8	34,7	0,0	0	36
Experimental	Vgat <sup>Flox</sup> 27	26,7	108,5	63,7	101,1	164,8	22,0	0,0	0	17
Experimental	Vgat <sup>Flox</sup> 28	14,9	100,8	55,7	128,6	184,3	17,7	0,0	0	15
Experimental	Vgat <sup>Flox</sup> 29	29,6	169,1	32,1	66,0	98,1	8,9	3,2	0	24
Experimental	Vgat <sup>Flox</sup> 35	34,7	114,9	90,8	59,6	150,4	22,9	0,0	0	29

Dados obtidos na análise com o *Behavioral Observation Research Interactive Software* do Teste Paradigma Residente- Intruso para todos os animais (intrusos) socialmente derrotado em exposição de 5 minutos. \*O comportamento de fuga compõe o comportamento de defesa ativa, no entanto o deixamos explícito devido a sua importância na defesa de camundongos.

Os resultados estatísticos do teste T não-pareado indicou que, em média, o grupo experimental (28,09s ± 3,95) gasta mais tempo em comportamentos sociais, quando comparado ao grupo controle (11,62s ± 1,67),  $t_{9,43} = -3,839$ ,  $p = 0,004$ ; o grupo experimental (135,95s ± 10,67) explorou mais a caixa moradia

do residente, quando comparado ao grupo controle ( $47,94s \pm 8,41$ ),  $t_{14} = -6,477$ ,  $p < 0,0001$ . Observamos uma redução do tempo total de comportamentos defensivos do grupo experimental ( $135,58s \pm 13,52$ ), quando comparado ao grupo controle ( $240,19s \pm 8,73$ ),  $t_{14} = 6,500$ ,  $p < 0,0001$ , e o grupo experimental ( $76,85s \pm 12,32$ ) apresentou menos comportamentos de defesa passiva, predominantemente o comportamento de congelamento, comparado ao grupo controle ( $169,66s \pm 7,74$ ),  $t_{14} = 6,381$ ,  $p < 0,0001$ .

Figura 14 - Comparação das médias de duração dos comportamentos em segundos, nos grupos Controle e Experimental nos casos Vgat<sup>Flox</sup>



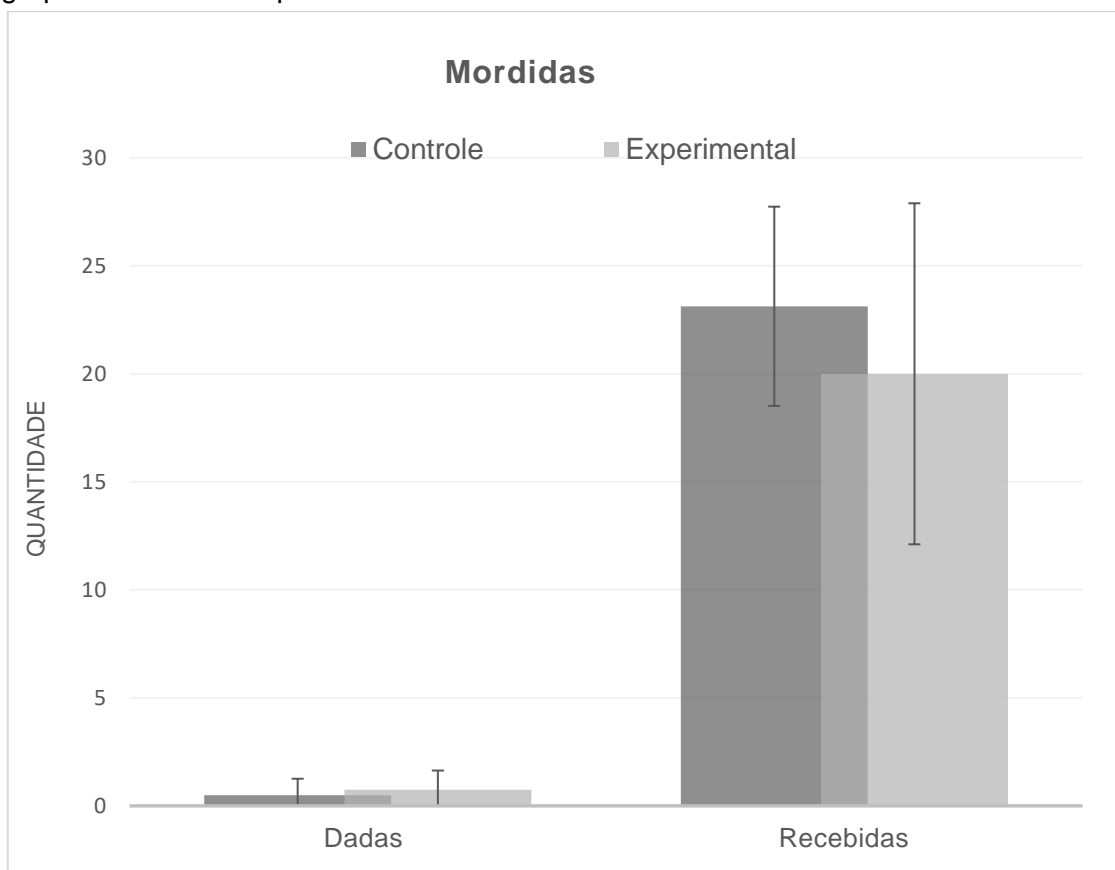
Dados quantificados, nos grupos Controle ( $n = 8$ ) e Experimental ( $n = 8$ ), do intruso socialmente derrotado em exposição de 5 minutos no Teste Paradigma Residente- Intruso. O \* indica dados que foram significativos no teste T (*Student Test*) quando comparados ao controle (\*  $p < 0,02$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ ). O comportamento de fuga faz parte do comportamento de defesa ativa, porém o tornamos explícito devido a sua importância na defesa.

O teste t independente mostra que não ocorreram diferença nos comportamentos de defesa ativa do grupo experimental ( $58,73s \pm 8,21$ ) comparado ao grupo controle ( $70,53s \pm 4,94$ ),  $t_{14} = 1,231$ ,  $p = 0,2385$ . Porém, dentro de defesa ativa, o comportamento de fuga foi menor no grupo

experimental ( $19,1s \pm 2,74$ ) comparado com o grupo controle ( $41,55s \pm 16,71$ ),  $t_{9,27}=3,271$ ,  $p=0,0127$ .

Não houve diferença no número de mordidas recebidas do grupo experimental ( $21,6 \pm 2,9$ ) comparado com o grupo controle ( $23,1 \pm 1,6$ ),  $t_{14}=0,967$ ,  $p=0,6612$ . Mordidas dadas e comportamentos classificados em “outros” também não apresentaram mudanças (Teste de Mann Whitney, Tabela 2). Na figura 15 estão os dados de mordidas dadas e recebidas em médias nos grupos.

Figura 15 - Comparação das médias da quantidade de mordidas dadas e recebidas, nos grupos Controle e Experimental nos casos Flox



Dados quantificados nos grupos Controle ( $n = 8$ ) e Experimental ( $n = 8$ ) do intruso socialmente derrotado em exposição de 5 minutos no Teste Paradigma Residente-Intruso

Na Tabela 3 estão descritos os dados estatísticos para as comparações das médias entre os grupos no teste comportamental.



Tabela 3 - Resultado do teste paradigma residente-intruso

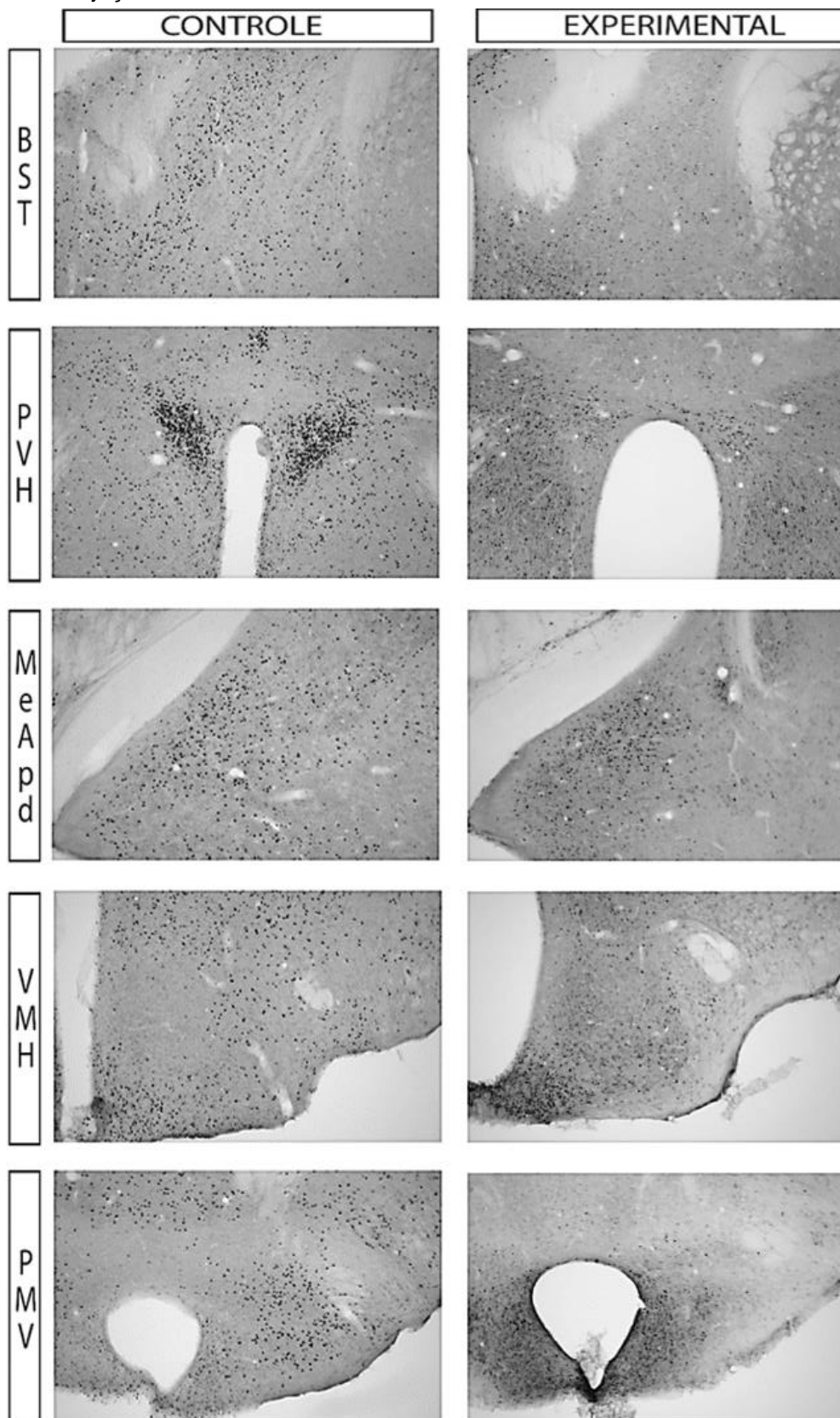
<b>Comportamentos</b>	<b>Controle</b>	<b>Experimental</b>	<b>Valor de p</b>
Sociais (s)	11,61 ± 1,67	28,09 ± 3,95	0,0040*
Exploratórios (s)	47,94 ± 8,41	135,94 ± 10,67	<0,0001*
Defensivos total (s)	240,19 ± 8,73	135,58 ± 13,52	<0,0001*
Defesa passiva (s)	169,66 ± 7,74	76,85 ± 12,32	< 0,0001*
Defesa ativa (s)	70,53 ± 4,93	58,73 ± 8,21	0,2385
Fuga (s)*	41,55 ± 6,71	19,1 ± 2,74	0,0127*
Outros(s)	0,28 ± 0,28	0,40 ± 0,40	0,9581
Mordidas dadas (un)	0,50 ± 0,3	0,60 ± 0,3	0,8748
Mordidas recebidas (un)	23,1 ± 1,6	21,6 ± 2,9	0,6612

\*O comportamento de fuga compõe o comportamento de defesa ativa, no entanto o deixamos explícito devido a sua importância na defesa de camundongos

### 3.2.3 Imunorreação pra Fos: Ativação neuronal

O caso Cflox32 e flox11 foram utilizados para demonstrar a ativação de Fos com marcação em imuno-histoquímica nos casos dos grupos controle e experimental (Figura 16). A contagem de células ativas com Fos não foram realizadas.

Figura 16 - Fotomicrografia de cortes frontal de camundongos  $Vgat^{Flx}$  (caso Controle,  $Vgat^{FlxC32}$  e Experimental,  $Vgat^{Flx11}$ ) imunorreagido com anticorpo (anti- Fos) que receberam injeção bilateral no MeA.



A figura mostra em um caso controle e um experimental a ativação neuronal em núcleos de interesse durante o teste de derrota social. Abreviaturas: ver lista.

## 4 DISCUSSÃO

Esse trabalho teve como objetivo investigar o papel das projeções gabaérgicas do MeA na organização da derrota social. Para isso, utilizamos o estudo anatômico de rastreamento das projeções eferentes gabaérgicas das subdivisões do MeA para identificar os alvos destas projeções e o estudo funcional para entender como essas projeções podem estar envolvidas na modulação desse comportamento.

Os dados obtidos do mapeamento das projeções eferentes gabaérgicas do MeA, podem ser comparados com as projeções observadas em ratos (Canteras e col., 1995), camundongos machos (Choi e col., 2005; Usunoffe col., 2009) e camundongos fêmeas (Pardo-Bellver e col., 2012).

Em nosso estudo, as projeções gabaérgicas do MeA posterodorsal para o BSTpr estão de acordo com o descrito em ratos por Canteras e col., 1995 e em camundongos (machos: Choi e col., 2005; Usunoff e col., 2009; fêmeas: Pardo- Bellver e col., 2012). Projeções observadas em nosso trabalho da porção posteroventral do MeA para o BSTpr estão de acordo com as que foram encontradas por Pardo-Bellver e col., (2012), mas não foram descritas em ratos por Canteras e col (1995). Já para a região do BSTif/tr, as projeções gabaérgicas do MeAanterior e posteroventral que encontramos também foram descritas em ratos e camundongos fêmeas (Canteras e col., 1995; Pardo-Bellver e col., 2012).

As projeções gabaérgicas encontradas no MPN provenientes da porção posterodorsal do MeA em camundongos estão de acordo com as projeções eferentes descritas do MeApd em ratos (Canteras e col.,1995) e camundongos fêmeas (Pardo-Bellver e col, 2012) porém, não foram encontradas as projeções para o MPN em camundongos para porções anterior e posteroventral descritas pelos mesmos autores.

Em relação ao PMV, observamos projeções gabaérgicas provenientes da porção anterior do MeA que estão de acordo com as descritas em estudos com ratos (Canteras e col., 1995) e em camundongos fêmeas (Pardo-Bellver e col 2012). Da mesma forma, as projeções provenientes da porção posterodorsal do MeA para o PMV, observadas em nosso estudo, equivalem as que já foram

descritas por Choi e col., 2005, com a mesma identidade química neuronal. Projeções do MeApd para o PMV foram observadas também em outros estudos (ratos: Canteras e col 1995; camundongos fêmeas: Pardo-Bellver e col., 2012; camundongos machos: Usunoff e col., 2009). Em nossos resultados, não encontramos projeções gabaérgicas para o PMV advindas do MeApv em camundongos machos, diferente dos dados relatados em ratos por Canteras e col. (1995) e em fêmeas (Pardo-Bellver e col., 2012).

Em suma, os dados aqui obtidos das projeções gabaérgicas do MeAa e do MeApd para o PMV sugerem que esse núcleo recebe projeções inibitórias dessas regiões do MeA em ratos e camundongos. Trabalhos anteriores em ratos (Canteras e col., 1995) e camundongos fêmeas (Pardo-Bellver e col., 2012) descreveram projeções do MeAa e MeApv para o MPN e do MeApv para o PMV que não foram observadas em nosso trabalho. Essa diferença pode indicar que essas projeções não descritas em nosso trabalho podem ter identidade química diferente da gabaérgica.

No presente estudo, observamos que as projeções gabaérgicas de todas as porções do MeA chegam nas regiões adjacentes do VMH, circundando o mesmo, enquanto as descritas por Canteras e col. (1995), adentram o VMH. Encontramos somente projeções da porção anterior para o VMHvl, que também foram observadas por Canteras e col (1995) e Pardo-Bellver e col (2012). Assim, o núcleo VMH parece não receber densas projeções gabaérgicas diretamente do MeA, podendo estar participando no circuito de defesa social, com outras informações químicas, como glutamatérgicas, que se propagam em grande densidade para as porções do VMH (Choi e col., 2005; Wang e col., 2019).

A análise visual dos botões terminais encontrados demonstra que esses núcleos não receberam apenas fibras de passagem, mas também são regiões de terminação axonal dos neurônios infectados no MeA. As projeções de todas as porções do MeA observadas nesse estudo estavam presentes em machos e fêmeas de maneira similar, também não encontramos diferenças qualitativas nas projeções da porção posterdorsal rostral e caudal do MeA.

Para testar como essas projeções gabaérgicas do MeA se organizam e modulam o comportamento defensivo social, propusemos o experimento 2 (Estudo Funcional) quando animais  $Vgat^{Flox}$  receberam bilateralmente no MeA (centro no MeApd) um vírus que expressa a enzima Cre, assim, esses neurônios gabaérgicos deixaram de liberar GABA na fenda sináptica.

A análise estatística do teste comportamental indicou uma significativa diminuição dos comportamentos de defesa total, caracterizada pela grande diminuição na defesa passiva (particularmente do *freezing*/ congelamento), e aumento da exploração e de comportamentos sociais, no grupo experimental comparado ao grupo controle.

Desconsideramos que essas alterações possam ser devido a uma alteração nos circuitos motores, relacionados a locomoção, uma vez que os dados estatísticos do teste de campo aberto, não apresentou diferenças entre os grupos controle e experimental. Da mesma forma, nossos dados não indicam que a diferença comportamental observada nos intrusos do grupo experimental seja em decorrência de uma possível diferença no comportamento do residente (residentes menos agressivos no grupo experimental), já que os dados de defesa ativa geral e mordidas recebidas, diretamente relacionados aos ataques do residente, não apresentou diferenças estatísticas.

A diminuição no comportamento defensivo total levou ao aumento de exploração e investigação social, provavelmente devido a um déficit na identificação do residente como uma ameaça. Estas alterações podem ter levado a menor nível de estresse e medo diante do coespecífico dominante. Segundo Wright (2012), o congelamento seria um importante indicativo de medo e, como visto em nossos resultados, animais cujos neurônios do MeA não liberavam GABA, expressaram menos congelamento frente a um coespecífico dominante quando comparados a um animal controle. No mesmo sentido, quanto aos níveis de estresse nestes animais, um indício da diminuição do estresse recai sobre nossa análise preliminar de ativação neural. Apesar de não termos feito a contagem de Fos, alguns cortes foram reagidos em ambos os grupos (controle, n=3 e experimental, n=4) e nossa análise qualitativa indica uma possível diminuição do número de células Fos positivas em uma estrutura fundamental

para mudanças neuroendócrinas e comportamentais relacionadas ao estresse, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH, Figura 16. Herman e Tasker, 2016; Daviu e col., 2019). Mais análises e estudos são necessários para a completa interpretação desses dados.

O aumento em comportamentos de investigação social visto em nosso trabalho indica uma perda no processamento de informações sociais do residente. Animais do grupo experimental expressaram comportamentos como, caminhar em direção ao residente e perseguir o residente (comportamentos de investigação social, raramente expressos por animais controles) e sugerem que ele não conseguia perceber o residente como uma ameaça social ou não conseguiam interpretar as pistas sociais do coespecífico e do ambiente, aumentando também a exploração na caixa moradia do residente. Esse comprometimento na identificação do coespecífico indica que os neurônios gabaérgicos do MeApd são cruciais na percepção dos estímulos sociais (macho-macho), principalmente olfatórios, recebidos do órgão vomeronasal e AOB.

Observamos diminuição no comportamento de fuga, importante parâmetro de defesa ativa em camundongos, nos animais experimentais em relação aos controles, mas não houve diferença na defesa ativa geral. Isso pode indicar que os animais experimentais tenham preferência por outros comportamentos de defesa ativa que não a fuga, como por exemplo *upright* com um maior enfrentamento do intruso ao agressor.

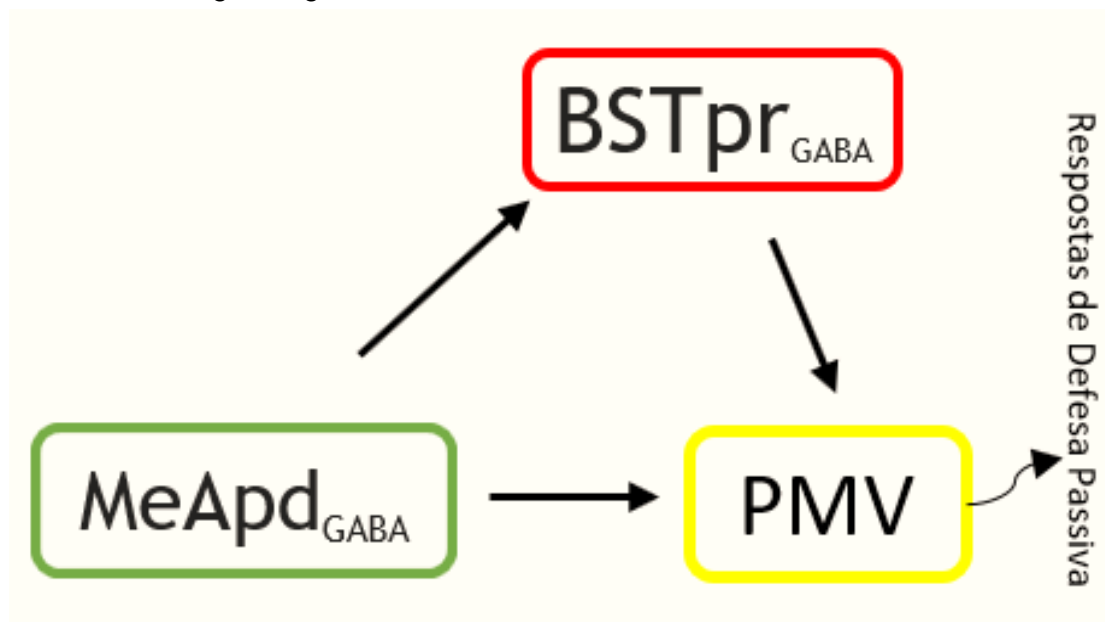
Yang e col. (2020) mostraram que a defesa ativa é organizada pelo VMH, eminentemente glutamatérgico (Choi e col., 2005; Wang e col., 2019), e sua projeção para a Substância Cinzenta Periaquedutal. Nosso grupo experimental não demonstrou alteração na defesa ativa geral e esse dado pode ser explicado por nosso estudo anatômico que indicou que o VMH não recebe projeções gabaérgicas diretas do MeApd. Assim, nossa manipulação funcional não afetou esse parâmetro comportamental.

É possível que vias paralelas e independentes estejam modulando comportamentos de defesa ativa (neurônios glutamatérgicos para o VMH) e defesa passiva (neurônios gabaérgicos para o PMV ou BST, Figura 17), e a

ativação simultânea dessas vias diante de um contexto de ameaça coespecífica, levaria a expressão de diferentes comportamentos de defesa social.

Assim, as projeções gabaérgicas do MeApd para o BSTpr e para o núcleo hipotalâmico sexualmente dimórfico, PMV, constituiriam uma possível via na organização da defesa social, na qual a liberação de GABA por neurônios do MeApd teria uma grande importância para o reconhecimento da ameaça numa situação de defesa intraespecífica e na articulação dos comportamentos defensivos, como indicado pelos nossos resultados

Figura 17 - Esquema demonstrando as conexões entre os núcleos envolvidos em um possível circuito gabaérgico de defesa social.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021. Abreviaturas: ver lista.

Estudos futuros com técnicas de perda de função gabaérgica no BSTpr ajudarão a entender o potencial envolvimento desse núcleo como intermediário do MeA, no circuito descrito acima para derrota social. Também, são necessários mais estudos que incluam fêmeas em contextos de derrota social para entender se essas mesmas vias descritas acima estão presentes e se organizam igualmente em respostas comportamentais específicas em ambos os sexos. A maioria dos estudos na área envolvem machos pela praticidade de trabalhar o paradigma comportamental estressor, entretanto em humanos, as mulheres são mais propensas a apresentar psicopatologias, como depressão e ansiedade.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que os neurônios gabaérgicos do MeApd modulam a defesa social, e a perda da função gabaérgica afeta diretamente os comportamentos expressos em um encontro agonístico com um coespecífico dominante, diminuindo comportamentos defensivos (defesa total e passiva), e aumentando comportamentos de investigação social e exploração. Assim, é possível que o MeApd exerça as funções observadas neste trabalho na defesa social por meio de suas projeções gabaérgicas para o BST ou PMV.



## 6 REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- Aleyasin, H., Flanigan, M. E., & Russo, S. J. Neurocircuitry of aggression and aggression seeking behavior: nose poking into brain circuitry controlling aggression. *Current opinion in neurobiology*, 2018; 49, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.013>
- Ayres, M., Ayres Jr, M., Ayres, D. L., Santos, A. A. S. *Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: IDSM, 2007.364p
- Bergado-Acosta, J. R., Sangha, S., Narayanan, R. T., Obata, K., Pape, H. C., & Stork, O. Critical role of the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase in consolidation and generalization of Pavlovian fear memory. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 2008; 15(3), 163–171. <https://doi.org/10.1101/lm.705408>
- Bergan, J. F., Ben-Shaul, Y., Dulac, C. Sex-specific processing of social cues in the medial amygdala. *Elife*, 2014; <https://doi.org/10.7554/eLife.02743>
- Billing, A., Henrique Correia, M., Kelly, D. A., Li, G. L., & Bergan, J. F. Synaptic Connections of Aromatase Circuits in the Medial Amygdala Are Sex Specific. *ENEURO*, 2020; 7(3), 0489-19. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0489-19.2020>
- Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Takahashi, T., Kelley, M. Attack and defensive behaviours in the albino rat. *Anim. Behav.* 1977; 25: 622-634.
- Canteras, N. S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; 71(3): 481-491.
- Canteras, N.S., Simerly, R.B., Swanson, L. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1995; 360:213–45.
- Carvalho, V. M. A., Nakahara, T.S., Cardozo, L. M., Souza, M. A. A., Camargo, A. P., Trintinalia, G.Z., Ferraz, E., Papes, F. Lack of spatial segregation in the representation of pheromones and kairomones in the mouse medial amygdala. *Front.Neurosci.* 2015; <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00283>
- Chen, P., & Hong, W. Neural Circuit Mechanisms of Social Behavior. *Neuron*, 2018; 98(1), 16–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.026>
- Choi, G. B., Dong, H. W., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Swanson, L. W., Anderson, D. J. Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*. 2005 May 19;46(4):647-60. doi: 10.1016/j.neuron.2005.04.011. PMID: 15944132.
- Crestani, C. C., Alves, F. H., Gomes, F. V., Resstel, L. B., Correa, F. M., & Herman, J. P. Mechanisms in the bed nucleus of the stria terminalis involved in control of autonomic and neuroendocrine functions: a review. *Current*

---

<sup>1</sup> De acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

neuropharmacology, 2013; 11(2), 141–159.  
<https://doi.org/10.2174/1570159X11311020002>

Daviu, N., Bruchas, M. R., Moghaddam, B., Sandi, C., Beyeler, A. Neurobiological links between stress and anxiety. *Neurobiol Stress*. 2019 Aug 13;11:100191. doi: 10.1016/j.ynstr.2019.100191. PMID: 31467945; PMCID: PMC6712367.

Dong, H. W, Swanson, L. W. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. *J Comp Neurol*. 2004 Apr 12;471(4):396-433. doi: 10.1002/cne.20002. Erratum in: *J Comp Neurol*. 2004 Jul 5;474(4):603-4. PMID: 15022261.

Dulac, C., Torello, A. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci*, 2003; 4, 551–562.  
<https://doi.org/10.1038/nrn1140>

Fanselow, M.S. e Ponnusamy, R. The use of conditioning tasks to model fear and anxiety. *Handbook of Anxiety and Fear*, Blanchard, RJ; Blanchard, DC; Griebel, G; Nutt, D (Eds.), Elsevier Press, 2008, 29-48.

Franklin, K. B.J. e Paxinos, G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Atlas. Academic Press, 2007, San Diego.

Friard, O. e Gamba, M. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods Ecol Evol*, 2016. 7: 1325-1330. doi:10.1111/2041-210X.12584

Friard, O. Detection of Objects and tracking Research Interactive Software – DORIS. 2020. Disponível em: <<http://www.boris.unito.it/pages/doris>>. Acesso em: 26 de fevereiro de 2021.

Fujihara, K., Sato, T., Miyasaka, Y., Mashimo, T., & Yanagawa, Y. Genetic deletion of the 67-kDa isoform of glutamate decarboxylase alters conditioned fear behavior in rats. *FEBS open bio*, 2021; 11(2), 340–353.  
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.13065>

Gabbay, V., Bradley, K. A., Mao, X., Ostrover, R., Kang, G., Shungu, D. C. Anterior cingulate cortex  $\gamma$ -aminobutyric acid deficits in youth with depression. *Transl Psychiatry*. 2017 Aug 22;7(8):e1216. doi: 10.1038/tp.2017.187. PMID: 28892070; PMCID: PMC5611750.

Golden, S. A., Covington, H. E., Berton, O., Russo, S. J. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc* 2011; 6, 1183–1191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.361>

Hammels, C., Pishva, E., De Vry, J., Van den Hove, D. L., Prickaerts, J., Van Winkel, R., Selten, J. P., Lesch, K. P., Daskalakis, N. P., Steinbusch, H. W., Van Os, J., Kenis, G., Rutten, B. P. Defeat stress in rodents: From behavior to molecules. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015 Dec; 59:111-40. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.10.006. Epub 2015 Oct 22. PMID: 26475995.

- Hashikawa, K., Hashikawa, Y., Falkner, A., & Lin, D. The neural circuits of mating and fighting in male mice. *Current opinion in neurobiology*, 2016; 38, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.01.006>
- Herman, J. P., Tasker, J. G. Paraventricular Hypothalamic Mechanisms of Chronic Stress Adaptation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016 Oct 31;7:137. doi: 10.3389/fendo.2016.00137. PMID: 27843437; PMCID: PMC5086584.
- Hodes, G. E., Pfau, M. L., Leboeuf, M., Golden, S. A., Christoffel, D. J., Bregman, D., Rebusi, N., Heshmati, M., Aleyasin, H., Warren, B. L., Labonté, B., Horn, S., Lapidus, K. A., Stelzhammer, V., Wong, E.H. F., Bahn, S., Krishnan, V., Bolaños-Guzman, C. A., Murrough, J. W., Merad, M., Russo, S. J. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014; 111(45), 16136–16141. doi:10.1073/pnas.1415191111
- Hong, W., Kim, D. W., Anderson, D. J. Antagonistic control of social versus repetitive self-grooming behaviors by separable amygdala neuronal subsets. *Cell*, 2014; 158(6), 1348–1361. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.049>
- Hsu, S.; Raine, L.; Fanger, H. The Use of Antiavidin Antibody and Avidin-Biotin-Peroxidase Complex in Immunoperoxidase Technics. *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 75, Issue 6, 1 June 1981, Pages 816–821
- Inagaki, H., Kiyokawa, Y., Tamogami, S., Watanabe, H., Takeuchi, Y., Mori, Y. Identification of a pheromone that increases anxiety in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014; 111(52), 18751–18756. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414710112>
- Itoh, K., Konishi, A., Nomura, S., Mizuno, N., Nakamura, Y., Sugimoto, T. Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. *Brain Res.* 1979 Oct 19;175(2):341-6
- Keshavarzi, S., Sullivan, R. K., Ianno, D. J., Sah, P. Functional properties and projections of neurons in the medial amygdala. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 2014; 34(26), 8699–8715. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1176-14.2014>
- Koolhaas, J. M., Coppens, C. M., de Boer, S. F., Buwalda, B., Meerlo, P., Timmermans, P. J. A. The Resident-intruder Paradigm: A Standardized Test for Aggression, Violence and Social Stress. *J. Vis. Exp.* 2013; (77), e4367, doi:10.3791/4367.
- LeDoux J. Rethinking the emotional brain. *Neuron*, 2012; 73(4), 653–676. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.004>
- Li, Y., Dulac, C. Neural coding of sex-specific social information in the mouse brain. *Developmental Neuroscience*, 2018; Volume 53, December 2018, Pages 120-130. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.07.005>

Li, Y., Mathis, A., Grewe, B. F., Osterhout, J. A., Ahanonu, B., Schnitzer, M. J., Murthy, V. N., & Dulac, C. Neuronal Representation of Social Information in the Medial Amygdala of Awake Behaving Mice. *Cell*, 2017; 171(5), 1176–1190.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.015>

Lischinsky, E. J., Sokolowski, K., Li, P., Esumi, S., Kamal, Y., Goodrich, M., Oboti, L., Hammond, T. R., Krishnamoorthy, M., Feldman, D., Huntsman, M., Liu, J., Corbin, J.G. Embryonic transcription factor expression in mice predicts medial amygdala neuronal identity and sex-specific responses to innate behavioral cues. *Elife*, 2017; <https://doi.org/10.7554/eLife.21012>

Long, Z., Medlock, C., Dziedzic, M., Shin, Y. W., Goddard, A. W., Dydak, U. Decreased GABA levels in anterior cingulate cortex/medial prefrontal cortex in panic disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013; 44, 131–135.

Makkar, S., Zhang, S. & Cranney, J. Behavioral and Neural Analysis of GABA in the Acquisition, Consolidation, Reconsolidation, and Extinction of Fear Memory. *Neuropsychopharmacol*, 2010; 35, 1625–1652. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.53>

Miczek, K. A. A new test for aggression in rats without aversive stimulation: differential effects of d- amphetamine and cocaine. *Psychopharmacol*, 1979; 60: 253-259.

Motta, S.C.; Guimaraes, C.C.; Furigo, I.C.; Sukikara, M.H.; Baldo, M.V.; Lonstein, J.S.; Canteras, N.S. Ventral premammillary nucleus revealing neural circuit for maternal aggression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 110(35):14438-14443.

Motta, S. C.; Goto, M.; Gouveia, F. V.; Baldo, M. V.; Canteras, N. S.; Swanson, L. W. Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106(12):4870-4875.

Müller, I., Çalişkan, G., Stork, O. The GAD65 knock out mouse – a model for GABAergic processes in fear- and stress-induced psychopathology. *Genes Brain Behav*, 2015; 14, 37–45.

Nordman, J. C., Ma, X., Gu, Q., Potegal, M., Li, H., Kravitz, A. V., Li, Z. Potentiation of Divergent Medial Amygdala Pathways Drives Experience-Dependent Aggression Escalation. *Journal of Neuroscience*. 2020; 17 June 2020, 40 (25) 4858-4880; DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0370-20.2020>

Padilla, S. L., Qiu, J., Soden, M. E., Sanz, E., Nestor, C. C., Barker, F. D., Quintana, A., Zweifel, L. S., Rønnekleiv, O. K., Kelly, M. J., Palmiter, R. D. Agouti-related peptide neural circuits mediate adaptive behaviors in the starved state. *Nat Neurosci*. 2016 May;19(5):734-741. doi: 10.1038/nn.4274. Epub 2016 Mar 28. PMID: 27019015; PMCID: PMC4846501.

Pardo-Bellver, C., Cádiz-Moretti, B., Novejarque, A., Martínez-García, F., Lanuza, E. Differential efferent projections of the anterior, posteroventral, and posterodorsal subdivisions of the medial amygdala in mice. *Front Neuroanat.* 2012 Aug 21;6:33. doi: 10.3389/fnana.2012.00033. PMID: 22933993; PMCID: PMC3423790.

Patel, D., Kas, M. J., Chattarji, S., Buwalda, B. Rodent models of social stress and neuronal plasticity: Relevance to depressive-like disorders. *Behavioural Brain Research*, 2019; Volume 369, 2019, 111900, ISSN 0166-4328, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111900>.  
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432819302773>)

Schür, R. R., Draisma, L. W., Wijnen, J. P., Boks, M. P., Koevoets, M. G., Joëls, M., Klomp, D. W., Kahn, R. S., Vinkers, C.H. Brain GABA levels across psychiatric disorders: A systematic literature review and meta-analysis of (1) H-MRS studies. *Hum Brain Mapp.* 2016 Sep;37(9):3337-52. doi: 10.1002/hbm.23244. Epub 2016 May 4. PMID: 27145016; PMCID: PMC6867515.

Simon, N. G., e Gandelman, R. Threat postures signal impending attack in mice. *Behavioral & Neural Biology*, 1981; 33(4), 509-513.  
[https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(81\)91923-3](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(81)91923-3)

Stowers, L., Cameron, P., & Keller, J. A. Ominous odors: olfactory control of instinctive fear and aggression in mice. *Current opinion in neurobiology*, 2013; 23(3), 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.007>

Tsubomoto, M., Kawabata, R., Zhu, X., Minabe, Y., Chen, K., Lewis, D. A., Hashimoto, T. Expression of transcripts selective for GABA neuron subpopulations across the cortical visuospatial working memory network in the healthy state and schizophrenia. *Cereb Cortex.* 2019 Jul 22;29(8):3540-3550. doi: 10.1093/cercor/bhy227. PMID: 30247542; PMCID: PMC6644854.

Usunoff, K. G., Schmitt, O., Itzev, D. E., Haas, S. J., Lazarov, N. E., Rolfs, A., Were, A. Efferent projections of the anterior and posterodorsal regions of the medial nucleus of the amygdala in the mouse. *Cells Tissues Organs.* 2009;190(5):256-85. doi: 10.1159/000209233. Epub 2009 Mar 13. PMID: 19287129.

Wang, L., Talwar, V., Osakada, T., Kuang, A., Guo, Z., Yamaguchi, T., & Lin, D. Hypothalamic Control of Conspecific Self-Defense. *Cell reports*, 2009; 26(7), 1747–1758.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.078>

Westberry, J. M., & Meredith, M. Characteristic Response to Chemosensory Signals in GABAergic Cells of Medial Amygdala Is Not Driven by Main Olfactory Input. *Chemical senses*, 2017; 42(1), 13–24.  
<https://doi.org/10.1093/chemse/bjw096>

White, S. F., Thornton, L. C., Leshin, J., Clanton, R., Sinclair, S., Coker-Appiah, D., Meffert, H., Hwang, S., & Blair, J. R. Looming Threats and Animacy: Reduced Responsiveness in Youth with Disrupted Behavior Disorders. *Journal of abnormal child psychology*, 2018; 46(4), 741–754.  
<https://doi.org/10.1007/s10802-017-0335-0>

Wright, D. Insights: fear of GAD. *FEBS Open Bio*, 2021; 11(2), 336–337. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13104>

Yang, F., Liu, Y., Chen, S., Dai, Z., Yang, D., Gao, D., Shao, J., Wang, Y., Wang, T., Zhang, Z., Zhang, L., Lu, W. W., Li, Y., Wang, L. A GABAergic neural circuit in the ventromedial hypothalamus mediates chronic stress-induced bone loss. *J Clin Invest*. 2020 Dec 1;130(12):6539-6554. doi: 10.1172/JCI136105. PMID: 32910804; PMCID: PMC7685749.

Zhang, K., Hill, K., Labak, S., Blatt, G. J., Soghomonian, J. J. Loss of glutamic acid decarboxylase (Gad67) in Gpr88-expressing neurons induces learning and social behavior deficits in mice. *Neuroscience*. 2014 Sep 5;275:238-47. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.06.020. Epub 2014 Jun 18. PMID: 24952328.