

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**

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

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

Orientador: Prof^a Dr Simone Cristina Motta

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública 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 MeAnterior	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 ^{CRE} (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 Vgatfêmea37), 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 ^{CRE} (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 ^{CRE} (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 ^{Flox} (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 ^{Flox}	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 ^{Flox} (caso Controle, Vgat ^{Flox} C32 e Experimental, Vgat ^{Flox} 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 MeA anterior	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 ¹	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, estabelecimento de hierarquia e submissão e as respostas emitidas nesses contextos podem ser inatas ou aprendidas (LeDoux, 2013).

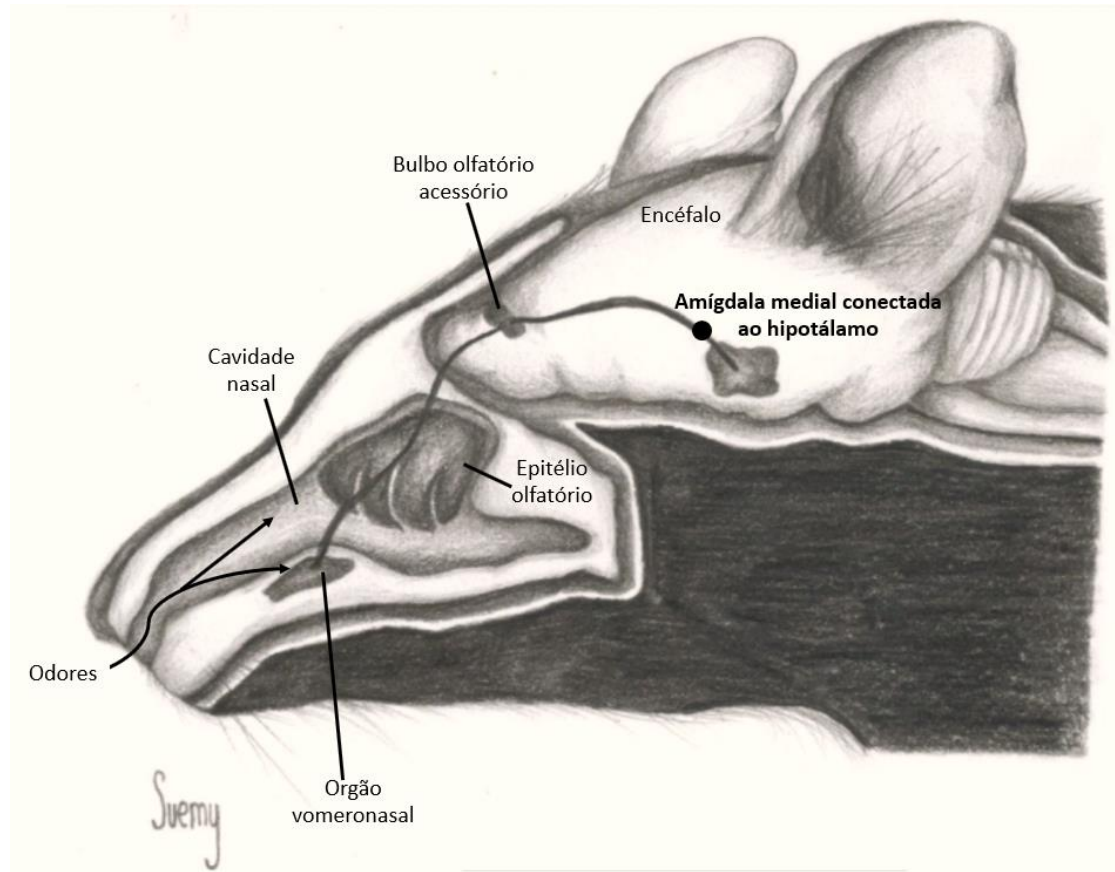
O repertório de comportamentos aprendidos é estruturado e adequado as experiências prévias do indivíduo. Já as reações inatas são os comportamentos que os animais exibem sem a necessidade de aprendê-los, que são as reações pré-programadas geneticamente (Lischinsky, e col., 2017), que garantem maiores 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), e 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



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

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 morfológica 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).

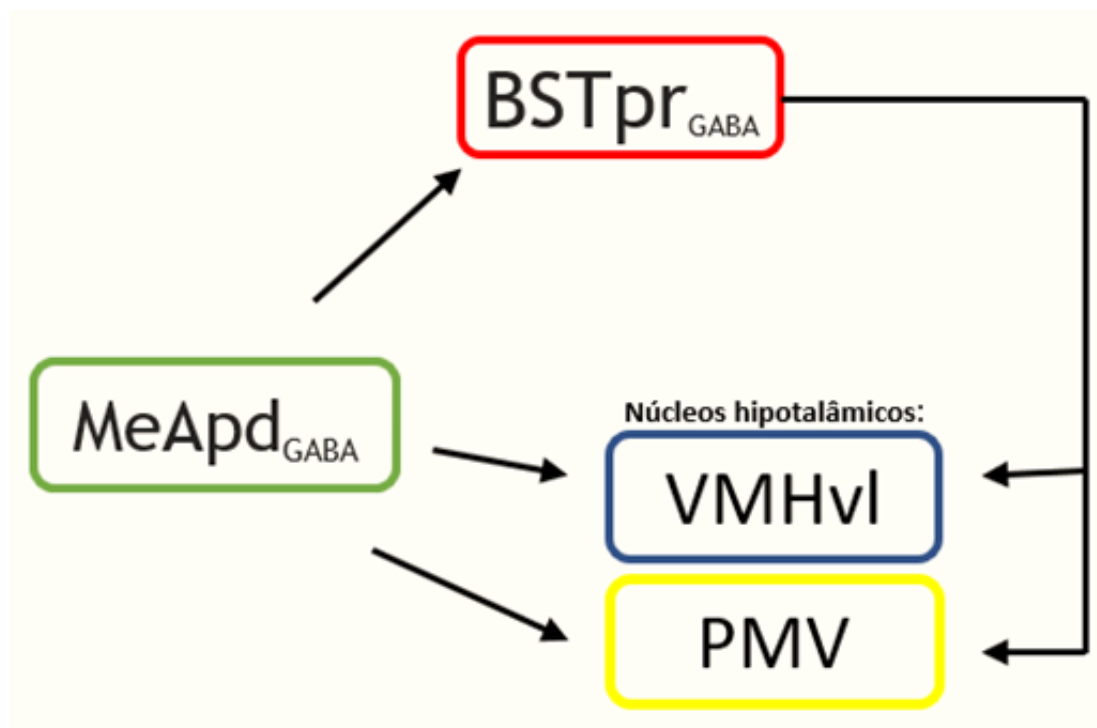
1.4 Neurônios gabaérgicos do MeA

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 Anexo 1

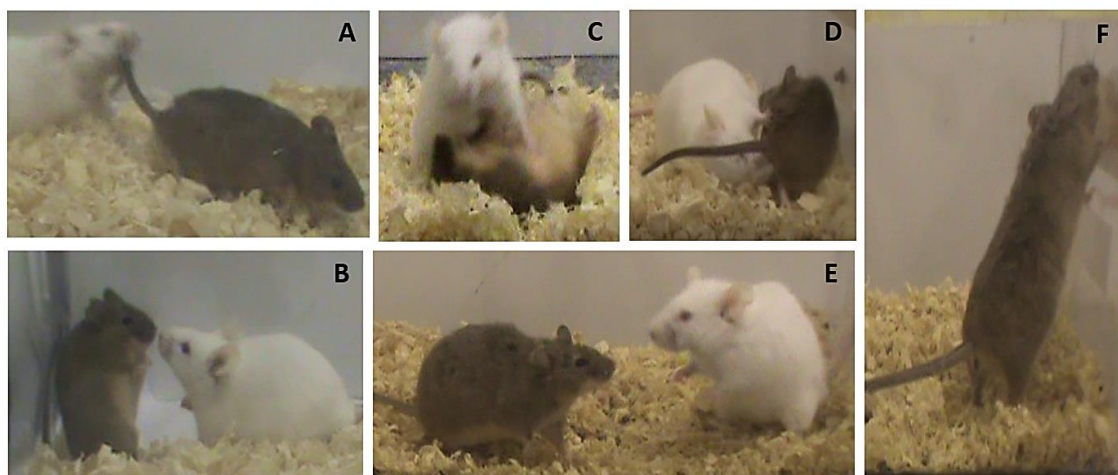
1.5 Modelos de estudo animal

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.

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 gabaérgicos para o BST ou PMV.

6 REFERÊNCIAS¹

- 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*

¹ 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 γ -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., Çalışkan, 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.

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.