

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**DEPARTAMENTO DE ANATOMIA**

**GABRIELA GONÇALVES NUNES**

**Estudo funcional e anatômico do núcleo medial da amígdala 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 de Título Mestre  
em Ciências.

São Paulo  
2021

GABRIELA GONÇALVES NUNES

**Estudo funcional e anatômico do núcleo medial da amígdala 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 de título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia de Sistemas

Orientador(a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Cristina Motta

Versão corrigida

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)

Gonçalves Nunes, Gabriela

Estudo funcional e anatômico do núcleo medial da  
amígdala na organização da defesa social / Gabriela  
Gonçalves Nunes; orientadora Simone Cristina Motta.  
-- São Paulo, 2021.

71 p.

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

1. defesa social. 2. núcleo medial da amígdala.  
3. farmacogenética. 4. hipotálamo. I. Cristina  
Motta, Simone , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): GABRIELA GONÇALVES NUNES

Título da Dissertação/Tese: **Estudo funcional e anatômico do núcleo medial da amígdala na organização da defesa social**

Orientador(a): Simone Cristina Motta

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **26/04/2021**, considerou o(a) candidato(a):

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

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

Nome: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Christie Ramos Andrade Leite Panissi  
Instituição: Universidade de São Paulo (USP) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP)  
Pós-Graduação em Psicobiologia

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

Nome: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Caroline Demarchi Munhoz  
Instituição: Universidade de São Paulo (USP) – Instituto de Ciências Biomédicas Pós-Graduação em Farmacologia

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

Nome: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Pereira Coltri  
Instituição: Universidade de São Paulo (USP) – Instituto de Ciências Biomédicas Pós-Graduação em Biologia de Sistemas

Presidente:                              Assinatura: .....

Nome: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Cristina Motta  
Instituição: Universidade de São Paulo (USP) – Instituto de Ciências Biomédicas Pós-Graduação em Biologia de Sistemas



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000  
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@cb.usp.br

Decl. CEUA.100.2018

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **58/2016/CEUA**, válido até 05/09/2020, e por solicitação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Simone Cristina Motta**, do Departamento de **Anatomia**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Gabriela Gonçalves Nunes** ao Projeto de Pesquisa "*Bases neurais de comportamentos sociais*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 28 de junho de 2018.

Prof.a. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora da CEUA-ICB/USP



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Bases neurais de comportamentos sociais*", registrado sob o protocolo nº **58/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **05/09/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Simone Cristina Motta**

- Departamento: *Anatomia*

- Membros da Equipe: *Amanda Barbosa Lisboa (Iniciação científica), Andre Bresser Pereira Takeshi (Iniciação científica), Amanda Ribeiro Oliveira (Técnico de laboratório), Renata Barreto Murayama (Iniciação científica), Rafael Pinetti (Iniciação científica), Marco Aurélio Santos (Iniciação científica)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico [www.icb.usp.br/ceua](http://www.icb.usp.br/ceua). Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretária da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Neural basis of social behaviors*", protocol nº **58/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **9/5/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Simone Cristina Motta**

- Team members: *Amanda Barbosa Lisboa (Undergraduate Student), Andre Bresser Pereira Takeshi (Undergraduate Student), Amanda Ribeiro Oliveira (Laboratory Technician), Renata Barreto Murayama (Undergraduate Student), Rafael Pinetti (Undergraduate Student), Marco Aurélio Santos (Undergraduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

| Espécie/Species     | Linhagem/Strain | Sexo/Gender         | Idade-Peso/ Age-Weight | Total      |
|---------------------|-----------------|---------------------|------------------------|------------|
| <i>Mus musculus</i> | <i>C57bl/6</i>  | <i>Macho/male</i>   | <i>60 dias/days</i>    | <i>550</i> |
|                     | <i>Swiss</i>    | <i>Macho/male</i>   | <i>60 dias/days</i>    | <i>80</i>  |
|                     | <i>Swiss</i>    | <i>Fêmea/female</i> | <i>60 dias/days</i>    | <i>80</i>  |

São Paulo, 12 de setembro de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes  
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento  
Secretária CEUA-ICB/USP

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu o sopro de vida. Sem a Sua presença eu não sou nada, vivo para adorá-Lo.

Ao meu marido e melhor amigo, Marcelo Okada, por me fazer ser uma pessoa melhor a cada dia, por me amar e cuidar de mim em todos os momentos, por me incentivar a seguir meus sonhos, por sempre tentar tirar um sorriso do meu rosto, sou abundante ao seu lado meu eterno companheiro.

Aos meus pais, Braulio Nunes e Jacinta Magna Gonçalves, por me amarem incondicionalmente, me instituírem sempre no melhor caminho, meus melhores exemplos de caráter e humildade, por me apoiarem mesmos nos momentos mais difíceis, por não medirem esforços em me proporcionar sempre a melhor educação, não há palavras que descrevam a minha gratidão, sou privilegiada por ter vocês como fonte de inspiração.

À minha irmã e melhor amiga Isabela Nunes, que sempre me alegra e me apoia em decisões difíceis com seu jeito meigo e sincero. Por ser a melhor irmã que alguém poderia ter, meu amor por você é indescritível.

À Universidade de São Paulo e ao programa de pós-graduação em Biologia de Sistemas por proporcionarem ótimas condições para a construção da minha carreira, com todo suporte e seriedade.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Cristina Motta, por toda dedicação e contribuição para a minha formação como aluna e profissional. Sempre com muito carinho, atenção e paciência.

À minha parceira na jornada acadêmica Érika Sterde, pelo supremo apoio, conselhos, suportes na realização dos protocolos laboratoriais, pelas trocas de experiências que proporcionaram a mim um alento em situações adversas. Te levarei como amiga para a vida.

Aos meus colegas do Laboratório de Neuroanatomia Funcional e ao Pro<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Newton Canteras, que diariamente contribuíram para o meu aprendizado e colaboraram para a realização deste trabalho.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e incentivo no desenvolvimento da pesquisa no país. Processo n<sup>o</sup> 2018/15757-3.

"Dificuldades preparam pessoas comuns para destinos extraordinários"  
(C.S. Lewis)

## RESUMO

NUNES, G. G. **Estudo funcional e anatômico do núcleo medial da amígdala na organização da defesa social**. 2021, 71p. Dissertação (Mestre em Biologia de Sistemas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Uma importante informação sensorial para a expressão de comportamentos defensivos é a olfatória, sendo o núcleo medial da amígdala (MeA) uma estrutura importante para veiculação de informações do co-específico, pois é uma região anatomicamente conectada aos órgãos sensoriais olfativos, como o vomeronasal (VNO), uma estrutura olfativa na cavidade nasal e o bulbo olfativo acessório (AOB). No entanto, poucos estudos em camundongos descreveram a respeito de como essa informação chega a estruturas neurais importantes para a organização desses comportamentos e qual seria a identidade química dessas projeções. Dessa forma, o presente trabalho buscou esclarecer os aspectos funcionais e anatômicos desses circuitos neurais, mapeando projeções glutamatérgicas envolvidas durante o comportamento de defesa social e inibindo de forma geral as subdivisões do medial da Amígdala. Para essa inibição, nós usamos injeções bilaterais de vírus que codificam receptores específicos (DREADDs inibitórios) no MeA em camundongos machos C57BL/6J. O grupo experimental recebeu injeções intraperitoneais de N-óxido de clozapina (CNO), que agem especificamente nos receptores DREADDs, e o grupo controle recebeu salina e posteriormente foram expostos ao co-específico dominante. Para então contribuir com o conhecimento anatômico das identidades químicas das projeções do MeA, nós usamos camundongos machos e fêmeas transgênicos *V-glut2-ires-cre* knock-in (C57BL/6J), que receberam injeções de vírus cre-dependente nas subdivisões do MeA. Esse vírus só foi expresso em neurônios glutamatérgicos, favorecendo, assim, a identificação de projeções glutamatérgicas. Os resultados do estudo funcional mostraram uma diminuição significativa no comportamento de defesa ativa (student's t test,  $p < 0,05$ ) no grupo experimental, quando comparado ao grupo controle. O resultado do mapeamento anatômico mostrou projeções glutamatérgicas eferentes da região anterodorsal do MeA para o núcleo ventromedial do hipotálamo a parte central, dorsomedial e ventrolateral (VMHc/dm/vl), o núcleo pré mamilar ventral (PMv) e para o núcleo intersticial da estria terminal a parte principal, interfascicular e transversa (BSTpr/if/tr). Já para as regiões anteroventral do MeA e posteroventral do MeA, encontramos projeções glutamatérgicas eferentes para os núcleos VMHc/dm/vl e o BSTpr/if/tr, mas não para o núcleo PMv. Aprovação do comitê de ética (CEUA, ICB-USP)#58/2016.

**Palavras-chave:** farmacogenética, amígdala, hipotálamo, defesa social, co-específico, residente-intruso.

## ABSTRACT

NUNES, G. G. **Functional and anatomical study of the medial nucleus of the amygdala in the organization of social defense**. 2021, 71p. Dissertation (Master thesis in Systems Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

An important sensory information for the expression of defensive behaviors is olfactory, and the medial nucleus of the amygdala (MeA) is an important structure for conveying information from the conspecific, since it is anatomically connected to olfactory sensory structures, such as the accessory olfactory bulb (AOB). However, little is known about how this information reaches important neural structures in the mouse for the organization of these behaviors and what the chemical identity of these projections would be. Thus, the present work aims to clarify the functional and anatomical aspects of this neural circuit, mapping areas involved in social defensive behavior and inhibiting the medial nucleus of the amygdala (MeA). For this inhibition, we used bilateral viral injections to express inhibitory DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) in MeA of male C57BL/6J mice. The experimental group received intraperitoneal injections of clozapine N-oxide (CNO), which act specifically on DREADD receptors, and the control group received saline, then both groups were exposed to a dominant conspecific. Then to anatomically clarify the chemical identity of the MeA projections, we used transgenic *V-glut2-ires-cre* knock-in (C57BL/6J) males and females, that received viral injection of the cre-dependent virus into MeA subdivisions. This virus was only expressed in glutamatergic neurons, favoring the identification of only glutamatergic projections. The results of the functional study showed a significant decrease in active defense behavior (student's t-test,  $p < 0.05$ ) in the experimental group, when compared to the control group. The result of the anatomical mapping showed efferent glutamatergic projections from the anterodorsal MeA towards the ventromedial of the hypothalamus nucleus (VMHc/dm/vl), ventral premammillary nucleus (PMv) and bed nucleus of the stria terminalis (BSTpr/if/tr). As for the anteroventral MeA and posteroventral MeA, glutamatergic efferent projections were found in the VMHc/dm/vl nuclei and BSTpr/if/tr, but not in the PMv. Ethics in animal research approval (CEUA, ICB-USP)#58/2016.

**Keywords:** pharmacogenetics; amygdala, hypothalamus; social defense, species specific; resident-intruder.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1-</b> Corte coronal da amígdala medial.....              | 22 |
| <b>Figura 2-</b> Diagrama da circuitaria da defesa social.....      | 24 |
| <b>Figura 3-</b> Diagrama indicando possíveis caminhos neurais..... | 25 |
| <b>Figura 4 -</b> Aparato para o teste de Campo Aberto.....         | 35 |
| <b>Figura 5-</b> Caixa moradia do animal residente.....             | 36 |
| <b>Figura 6-</b> Comportamento defensivo <i>freezing</i> .....      | 37 |
| <b>Figura 7-</b> Comportamento defensivo <i>upright</i> .....       | 38 |
| <b>Figura 8-</b> Comportamento defensivo <i>flight</i> .....        | 38 |
| <b>Figura 9-</b> Comportamento exploratório “cheirar saída” .....   | 39 |
| <b>Figura 10-</b> Fotomicrografia imunohistoquímica MeAad.....      | 45 |
| <b>Figura 11-</b> Fotomicrografia imunohistoquímica MeAav.....      | 46 |
| <b>Figura 12-</b> Fotomicrografia imunohistoquímica MeApv.....      | 47 |
| <b>Figura 13-</b> Fotomicrografia do sítio de injeção do vírus..... | 50 |
| <b>Figura 14-</b> Plate imunofluorescência para Fos.....            | 56 |
| <b>Figura 15-</b> Plate imunofluorescência para Fos.....            | 57 |
| <b>Figura 16-</b> Plate imunofluorescência para Fos.....            | 58 |
| <b>Figura 17-</b> Plate imunofluorescência para Fos.....            | 59 |
| <b>Figura 18-</b> Plate imunohistoquímica para Fos.....             | 62 |
| <b>Figura 19-</b> Plate imunohistoquímica para Fos.....             | 63 |
| <b>Figura 20 -</b> Corte coronal da região do MeA.....              | 65 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|  |    |
|--|----|
| <b>Gráfico 1-</b> Distância percorrida em centímetros quadrados.....                 | 48 |
| <b>Gráfico 2-</b> Contagem do tempo em segundos gasto no centro ou na periferia..... | 49 |
| <b>Gráfico 3-</b> Comportamento da Defesa Total.....                                 | 51 |
| <b>Gráfico 4-</b> Comportamento de Defesa Passiva.....                               | 51 |
| <b>Gráfico 5-</b> Comportamento de Defesa Ativa.....                                 | 52 |
| <b>Gráfico 6-</b> Comportamento de <i>upright</i> .....                              | 52 |
| <b>Gráfico 7-</b> Comportamento Social.....  | 53 |
| <b>Gráfico 8-</b> Comportamento Exploratório.....                                    | 53 |
| <b>Gráfico 9-</b> Outros Comportamentos.....   | 54 |
| <b>Gráfico 10-</b> Análise comportamental dos animais residentes.....                | 55 |
| <b>Gráfico 11-</b> Densidade de células Fos-positivas na região do MeA.....          | 60 |
| <b>Gráfico 12-</b> Densidade de células Fos-positivas na região do hipotálamo.....   | 64 |
| <b>Gráfico 13-</b> Densidade de células Fos-positivas na região do BST.....          | 64 |

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1-** Concentração dos Anticorpos no processamento imunohistoquímico.....42

**Tabela 2-** Concentração dos Anticorpos no processamento de imunofluorescência.....43

**Tabela 3-** Porcentagem de ativação e inibição das subdivisões do MeA.....60

**LISTA DE ABREVIATURAS**

3V - terceiro ventrículo

AOB - bulbo olfativo acessório

AHN - Núcleo anterior do hipotálamo

BST - Núcleo intersticial da estria terminal

BSTpr - Núcleo intersticial da estria terminal, parte principal

BSTif - Núcleo intersticial da estria terminal, parte interfascicular

BSTtr - Núcleo intersticial da estria terminal, parte transversa

CNO - N-óxido de clozapina

DREADDs - *Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs*

LH - Hipotálamo Lateral

MeA - Núcleo medial da amígdala

MeAad - Núcleo medial da amígdala, parte anterodorsal

MeAap - Núcleo medial da amígdala, parte anteroposterior

MeApd - Núcleo medial da amígdala, parte posterodorsal

MeApv - Núcleo medial da amígdala, parte posteroventral

MPN - Núcleo pré-óptico medial

MPO - área pré-óptica medial do hipotálamo

opt - Trato óptico

PMd- Núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo

PMv - Núcleo pré-mamilar ventral

VMH - Núcleo ventromedial do hipotálamo

VMHc- Núcleo ventromedial parte central

VMHdm - Núcleo ventromedial parte dorsomedial, do hipotálamo

VMHvl - Núcleo ventromedial parte ventrolateral, do hipotálamo

VNO - órgão vomeronasal

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | 17 |
| 1.1 Comportamentos sociais                                       | 17 |
| 1.2 Defesa social  | 18 |
| 1.3 Paradigma Residente-Intruso (Miczek, 1979)                   | 19 |
| 1.4 Núcleo Medial da Amígdala (MeA)                              | 20 |
| 1.5 Circuitos neurais de defesa social: do MeA para o hipotálamo | 21 |
| 1.6 Manipulação Gênica   | 25 |
| 1.7 Identidade química do MeA                                    | 25 |
| <b>HIPÓTESE</b>  | 27 |
| <b>OBJETIVOS</b>   | 27 |
| <b>2. MÉTODOS</b>  | 28 |
| 2.1 Animais  | 28 |
| 2.2 Vírus Adeno-associado (AAVs)                                 | 29 |
| 2.3 Grupo experimental   | 29 |
| 2.4 Delineamento experimental                                    | 30 |
| 2.5 Cirurgia Estereotáxica                                       | 31 |
| 2.6 Open field ou Teste de Campo Aberto                          | 32 |
| 2.7 Paradigma Residente–Intruso (Miczek,1979)                    | 33 |
| 2.7.1 Aparato Experimental                                       | 33 |
| 2.7.2 Teste de territorialidade                                  | 33 |
| 2.7.3 Análise Comportamental do Animal Intruso                   | 34 |
| 2.7.4 Análise Comportamental do Animal Residente                 | 36 |
| 2.7.5 Análise Estatística  | 37 |
| 2.8 Perfusão   | 37 |
| 2.9 Microtomia e Histologia                                      | 38 |
| 2.10 Imunohistoquímica   | 38 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.11 Imunofluorescência   | 39        |
| <b>3. RESULTADOS</b>  | <b>40</b> |
| 3.2 Estudo com inibição farmacogenética na região do MeA envolvidos no comportamento de defesa social | 44        |
| 3.2.1 Teste de Campo Aberto (Open Field)  | 44        |
| 3.2.2 Histologia e Testes comportamentais   | 45        |
| 3.3 Imunofluorescência  | 51        |
| 3.4 Imunohistoquímica   | 57        |
| <b>4. DISCUSSÃO</b>   | <b>61</b> |
| 4.1 Estudo de mapeamento das projeções glutamatérgicas eferentes do MeA                               | 61        |
| 4.2 Estudo com inibição farmacogenética na região do MeA envolvidos no comportamento de defesa social | 62        |
| <b>5. CONCLUSÃO</b>   | <b>66</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | <b>67</b> |

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Comportamentos sociais

Os comportamentos sociais são particularmente cruciais para os mamíferos. A habilidade de criar e manter relações sociais diversas, é crítica para a sobrevivência da espécie, uma vez que em uma sociedade existem indivíduos de várias espécies diferentes e esses fatores moldam a evolução de seu comportamento social (Adolphs, 1999). Comportamentos denominados inatos são aqueles geneticamente determinados e são representados em resposta a um sinal (Crabbe et al., 1999). Como por exemplo os comportamentos sexuais específicos para cada espécie, e que ainda se diferenciam entre machos e fêmeas, onde cada comportamento inclui um amplo conjunto de coordenadas e exibições sexuais que garantem estratégias reprodutivas e a sobrevivência da própria espécie (Dulac e Kimchi, 2007).

Os comportamentos sociais não estão relacionados apenas a táticas reprodutivas bem sucedidas. O motivo que mantém os animais vivos na vida selvagem é o fato de terem reações defensivas inatas muito eficazes, quando encontram qualquer tipo de estímulo novo ou repentino (Bolles, 1970). Eles não podem se permitir aprender a escapar, pois a sobrevivência é muito urgente, as oportunidades de aprendizado são muito limitadas e os parâmetros das situações tornam impossíveis os aprendizados necessários para determinada situação (Bolles, 1970). Então, o animal que sobrevive é aquele que vem para o ambiente com reações defensivas prontamente disponíveis em seu repertório (respostas defensivas inatas), tais reações de defesa podem ocorrer em resposta a uma série de estímulos incluindo a do predador ou de um co-específico (Blanchard e Blanchard, 1989).

Boa parte da identificação do co-específico ou de um possível predador em roedores, provém de um processamento de sinais químicos por neurônios sensoriais do animal, pelo órgão vomeronasal (VNO) (Dulac e Torello, 2003). A cavidade nasal dos roedores contém dois conjuntos de neurônios quimiossensoriais localizados um no VNO e outro no epitélio olfatório principal (MOE), respectivamente. Receptores vomeronasais detectam pistas feromonais emitidas durante encontros sociais, levando à ativação de conjuntos neurais distintos no VNO que são projetados para o bulbo olfatório acessório (AOB) (Belluscio et al., 1999) onde ocorrem diversas conexões sinápticas e indicam que ali já ocorre uma ampla integração de informações químicas (Dulac e Torello, 2003).

Os feromônios são compostos químicos usados pela maioria das espécies como um tipo de comunicação ou sinalização celular, para fornecer ao animal informações sobre o *status* de outro

indivíduo (Dulac e Kimchi, 2007). São secretados por glândulas, da região anogenital ou da urina e capazes de gerar respostas fisiológicas e comportamentais (Dulac e Torello, 2003). Estes sinais químicos são frequentemente regulados por hormônios. Dulac e Wagner (2006), descreveram em roedores o duplo papel dos órgãos VNO e AOB que, na presença de feromônios, irão controlar o acasalamento, agressão e identificação de gênero em um encontro social.

## **1.2 Defesa social**

Do ponto de vista biológico, o ambiente social se torna uma fonte considerável de estresse e um único encontro social pode resultar em uma derrota para um dos animais. Já se sabe que dentro de uma espécie pode haver estratégias diferentes para lidar com uma possível derrota. Von Holst (1986) colocou musaranhos em um território delimitado que resultou em combates. O vencedor se tornou dominante e teve aumento no peso corpóreo, enquanto os derrotados ficaram divididos em um grupo que continuou ativo, porém de forma mais contida com respostas elevadas de estresse e outro grupo que ficou desmobilizado com respostas de cortisol e corticosterona muito elevadas, não sobreviveram após 14 dias do confronto.

Meerlo e colaboradores (2009) descreveram que um único episódio de derrota social, baseado no paradigma-residente intruso, em ratos causou efeitos no comportamento e no ritmo circadiano pelo menos 4 dias depois. Eles concluem que derrotas sociais têm efeitos fisiológicos em animais por períodos longos que podem afetar sua sobrevivência. Sgoifo e colaboradores (2015), trabalhando com camundongos mostraram que repetidas exposições ao paradigma residente-intruso levam ao estresse social crônico ocasionando alterações cardiovasculares, como danos no miocárdio, principal fator de risco para insuficiência cardíaca. De forma mais detalhada, o estudo mostrou que os animais intrusos subordinados ao residente, tiveram um volume de fibroses na parede do ventrículo esquerdo 6 vezes maior do que nos animais controles, eles concluíram que o estresse social crônico induz a mudanças estruturais e pode até gerar uma suscetibilidade a arritmias.

Estudos em roedores padronizaram o teste comportamental baseado na resposta desses animais mediante a agressão, ameaça e estresse social. Em uma situação em que um animal intruso é inserido na caixa moradia de um co-específico dominante, este modelo é conhecido como paradigma residente-intruso (Miczek, 1979).

### 1.3 Paradigma Residente-Intruso (Miczek, 1979)

Modelo experimental baseado na territorialidade inata dos animais sendo vastamente utilizado em estudos devido ao conhecimento dos padrões comportamentais e à facilidade de distinção desses padrões nos animais envolvidos (Koolhaas et al., 2013). É caracterizado por um conjunto de comportamentos típicos da espécie realizados em estreita interação com o adversário. O comportamento agressivo pertence ao repertório natural da maioria das espécies animais e pode ser considerado uma forma altamente funcional de comunicação social para controle ativo do ambiente (Blanchard et al., 2003).

Dessa forma, animais dominantes, residentes de uma colônia bem estabelecida, expressam comportamentos de ameaça e ataque quando confrontados a um intruso (Blanchard e Blanchard, 1977; Blanchard e col. 1977). Topograficamente, nesse encontro agonístico, o animal dominante expressa uma sequência de comportamentos introdutórios, tais como se aproximar e cheirar o intruso, seguidos de ataques frequentes, com embates que objetivam morder o intruso e, posteriormente, um período no qual esses ataques se tornam mais escassos, sendo que movimentos do intruso ainda podem desencadeá-los (Blanchard e Blanchard, 1977). O animal intruso expressa comportamentos defensivos, podendo até ser considerado como agressão defensiva, em resposta a um ataque por outro indivíduo. Tais comportamentos podem ser de evitação, composto pelo *boxing* e pela postura *upright* quando o animal se sustenta sobre as patas traseiras e com as patas dianteiras mantém o residente longe de seu corpo, também expressa comportamentos de fuga ou *flight*, manter-se sobre o dorso ou *on-the-back* e congelamento ou *freezing* (Blanchard e col. 1977).

O paradigma Residente-Intruso permite a expressão espontânea e natural do residente e do intruso em um ambiente controlado seminatural. Além disso, se baseia no fato de que o macho adulto irá estabelecer um território e que essa territorialidade é ainda mais reforçada na presença de uma fêmea, conseqüentemente esse macho irá atacar outros machos estranhos intrusos em sua gaiola (Albert et al., 1988).

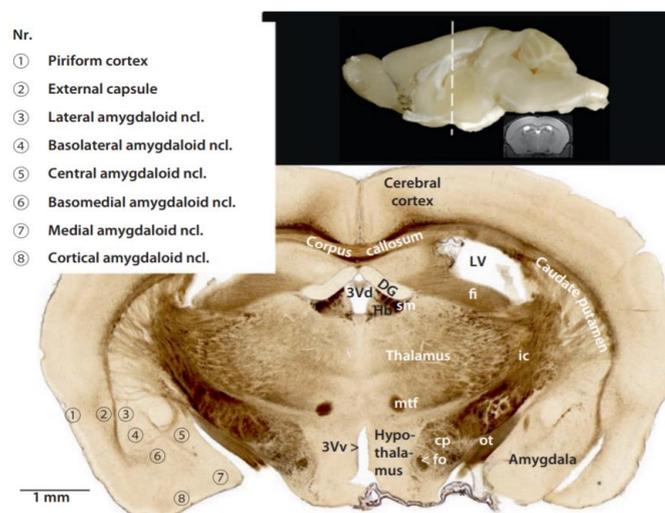
Uma das formas como os animais recebem esses estímulos, principalmente em um confronto social, provém de projeções neuronais do VNO e AOB majoritariamente para o núcleo da amígdala medial (MeA) que por sua vez se conecta às regiões hipotalâmicas associadas ao controle de comportamentos (Canteras et al., 1995; Keshavarzi et al., 2014).

#### 1.4 Núcleo Medial da Amígdala (MeA)

A amígdala é uma unidade de processamento importante para os aspectos emocionais na percepção de sinais e para a geração de padrões comportamentais (Schroder, Moser e Huggenberger, 2020). É conservada dos mamíferos mais primitivos e na maioria dos vertebrados. O MeA é a parte mais medial da amígdala e assim como no encéfalo de humanos, a amígdala de camundongos se localiza na superfície telencefálica ventral (Figura 1). Recebe projeções neurais essencialmente de áreas sensoriais do cérebro, bem como áreas de processamento de memória e regiões cognitivas. Envia projeções de volta para muitas dessas áreas e se comunica com o tronco encefálico e outras áreas subcorticais do sistema límbico, relacionado aos aspectos perceptivos e motivacionais do comportamento social (Spezio et al., 2007; Bickart et al., 2016). Notavelmente, tais circuitos estão envolvidos na defesa e em comportamentos predatórios (Freese e Amaral, 2009; Han et al., 2017). Além disso, assim como o núcleo cortical (Bickart et al., 2011), o medial da amígdala recebe predominantemente projeções olfativas.

Cárdiz-Moretti e colaboradores (2016) descreveram um padrão de traçamento retrógrado comum do VNO para os subnúcleos do medial da amígdala, o posterodorsal MeApd e a porção posteroventral (MeApv) em camundongos. A amígdala medial também possui subnúcleos anteriores, o anterodorsal (MeAad) e o anteroventral (MeAav) (Swanson e Petrovich, 1998).

**Figura 1:** Corte coronal feito em vibrátomo no encéfalo de camundongos (C57BL/6) no nível do núcleo habenular (Hb). DG- giro denteado; Cp- pedúnculo cerebral; fi- fímbria hipocampal; fo- fórnice; ic- cápsula interna; LV- ventrículo lateral; mtf= fascículo mamilotalâmico; ot- trato óptico; sm- estria medular; 3Vd- terceiro ventrículo dorsal; 3Vv- terceiro ventrículo ventral.



Fonte:(Schroder, Moser e Huggenberger, 2020-modificada).

O MeA recebe e é ativado pela entrada de densas projeções do VNO cujo neurônios sensoriais se conectam diretamente com o AOB e, dessa forma, veicula informações cruciais para a modelagem de comportamentos sociais (Carvalho e col., 2015) como já citado. Além disso, atua na identificação do gênero de outro animal e no provimento de pistas espécies-específicas no controle do comportamento sexual e agressivo (Canteras e col., 1995; Dulac e Torello, 2003; Chamero e col., 2007); também tem o papel de informar status social e reprodutivo, condições de saúde e habilidade competitiva (Brennan e Kendrich, 2006). Todas as características desse núcleo o tornam crucial em um encontro agonístico enquanto ocorre sua ativação e de seus núcleos alvos.

### **1.5 Circuitos neurais de defesa social: do MeA para o hipotálamo**

Canteras e colaboradores (1995) descreveram detalhadamente em ratos as vias neuronais das regiões anteroventral, posterodorsal e posterodorsal do MeA pelo método de *Phaesolus uulgaris leucoagglutinin* (PHAL) em ratos machos. O estudo resultou em marcações anterógradas das entradas ou *inputs* para os núcleos corticais, hipotalâmicos, além do AOB. Atualmente já se sabe que a organização das conexões da amígdala, em comportamentos sociais, a coloca em uma posição central para modular uma variedade de redes cerebrais importantes na cognição. Freese e Amaral (2006) mostraram que a amígdala compartilha conexões com áreas de associação visual no córtex temporal ventral e lateral implicadas no processamento de sinais sociais, como ações faciais em macacos.

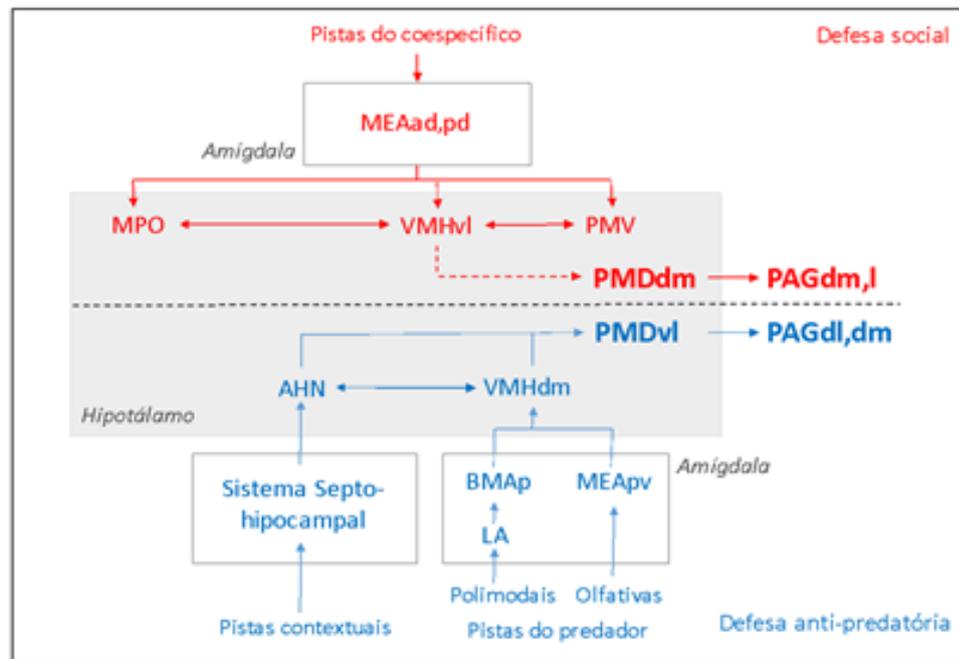
Cádiz-Moretti e colaboradores (2014) também analisaram as projeções eferentes das subdivisões do MeA usando injeções restritas de *fluorogold* em camundongas fêmeas e os resultados mostraram que o MeApd e MeApv recebem projeções robustas para diversos núcleos, como: o AOB, o córtex piriforme, a parte principal do núcleo intersticial da estria terminal (BSTpr) entre outros.

Em relação a defesa social durante um encontro agonístico as bases neurais que modulam esse comportamento já foram alvo de trabalhos anteriores em nosso laboratório e mostraram o envolvimento de núcleos hipotalâmicos na organização desse comportamento em ratos (Motta et al., 2009; Motta e Canteras, 2015). O hipotálamo é uma estrutura diencefálica responsável pela organização de comportamentos motivados (Swanson, 2000), integrando respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais, de forma geral, regulando o metabolismo e preparando o corpo para a situação que o animal se encontra, garantindo a sobrevivência de um indivíduo ou de uma espécie (Canteras, 2012). É dividido em três zonas longitudinais no sentido médio-lateral, chamadas periventriculares, medial e lateral (Swanson, 2000).

Também chamada de coluna de controle comportamental devido a sua importante participação na iniciação de comportamentos motivados (Swanson, 2000; Canteras, 2002), a zona medial do hipotálamo é composta no sentido rostrocaudal pelos núcleos pré-óptico medial anterior (MPO), parte descendente do paraventricular (PHA), ventromedial (VMH), tuberal (TU), pré-mamilar ventral (PMV) e dorsal (PMD) e os corpos mamilares (Swanson, 2000; Canteras, 2002). Trabalhos com traçadores neuronais indicaram a existência de dois grupos de núcleos altamente interconectados na zona medial do hipotálamo (Canteras et al., 1995; Wang et al., 2017; Wang et al., 2019). Um grupo inclui o núcleo pré-óptico medial MPO, a parte ventrolateral do núcleo ventromedial (VMHvl), o núcleo TU e o PMV, formando a parte *core* do circuito sexualmente dimórfico, chamado assim por apresentar alta expressão de RNAm para os receptores de andrógenos e estrógenos e, com isso, este circuito difere, morfológica e funcionalmente, entre machos e fêmeas (Simerly et al., 1990).

Em trabalho anterior de nosso laboratório, identificamos que o circuito mobilizado durante a defesa social é distinto do circuito da defesa anti-predatória (Motta et al., 2009). A figura 2 faz um resumo da comparação destes sistemas neurais envolvidos em diferentes tipos de comportamentos defensivos.

**Figura 2:** Diagrama indicando que circuitos diferentes organizam os diferentes tipos de comportamentos defensivos. O circuito em vermelho é mobilizado durante a defesa social, enquanto o azul é ativado na defesa anti-predatória. Neste diagrama as informações, tanto do co-específico como do predador, chegam ao hipotálamo por diferentes núcleos amigdalianos e, na defesa anti-predatória, as informações contextuais influenciam o circuito hipotalâmico por estruturas septo-hipocámpais conhecidas. Não se sabe se informações contextuais influenciam a defesa social. As setas cheias indicam projeções diretas, as setas tracejadas, projeções indiretas. Abreviaturas: AHN – núcleo anterior; BMAp – núcleo basomedial posterior da amígdala; LA – núcleo lateral da amígdala; MEAad, pd, pv – núcleo medial da amígdala, parte anterodorsal, parte posterodorsal, parte posteroventral; MPO - área pré-óptica medial; PAGdl, dm, l – substância cinzenta periaquedutal, coluna dorsolateral, coluna dorsomedial, coluna lateral; PMd – núcleo pré-mamilar dorsal; PMv – núcleo pré-mamilar ventral; VMH, vl, dm – núcleo ventromedial, parte ventrolateral, parte dorsomedial.



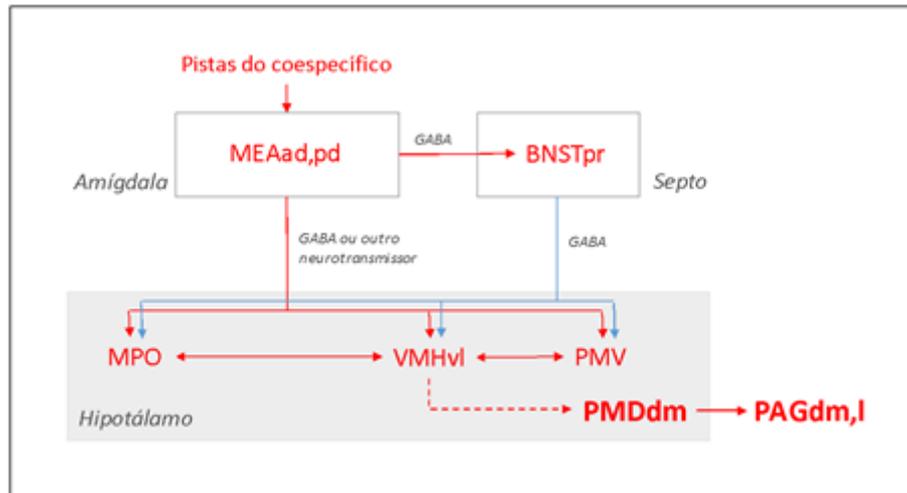
Fonte: Diagrama baseado na figura de Motta et al. (2009)

Como é possível notar na figura 2, o comportamento de defesa social não mobiliza o circuito de defesa hipotalâmico, mas o, sexualmente dimórfico; já implicado na organização de diversos comportamentos sociais (Numan e col., 1977; Pfaff e Sakuma, 1979a,b; Kollack-Walker e Newman, 1995; Veening e Coolen, 1998; Newman, 1999; Motta e col., 2009; Lin e col., 2011; Motta e col., 2013).

Todos os elementos desse circuito recebem projeções do MeA, porção posterodorsal (MeApd) (Canteras e col., 1995) sendo essa estrutura também sexualmente dimórfica (Simerly e col., 1990). Motta e colaboradores (2009 e 2013) mostraram que essa região é mobilizada durante diferentes comportamentos sociais. Estudos de Bergan e colaboradores (2014) mostraram que registros elétricos no MeApd de camundongos anestesiados revelaram diferenças dependentes do sexo nas respostas neurais às pistas sociais, concomitante com os estudos de Motta e colaboradores (2009 e 2013).

A figura abaixo é um esquema que indica os possíveis caminhos por onde o MeApd e MeAad, estariam influenciando o circuito sexualmente dimórfico do hipotálamo. As pistas olfativas do co-específico ativam o MeA que pode diretamente influenciar os núcleos hipotalâmicos indicados na figura 3.

**Figura 3-** Diagrama indicando possíveis caminhos neurais por onde o MeA pd influencia o circuito sexualmente dimórfico do hipotálamo. Abreviaturas: BSTpr- núcleo intersticial da estria terminal, parte principal; MEAad, pd- núcleo medial da Amígdala, parte anterodorsal, parte posterodorsal; MPO- área pré-óptica medial do hipotálamo; PAGdm,I- Substância Cinzenta Periaquedutal, coluna dorsomedial, coluna lateral; PMDdm- núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo, parte dorsomedial; PMV- núcleo pré-mamilar ventral do hipotálamo; VMHvl- núcleo ventromedial do hipotálamo, parte ventrolateral.



Fonte: Profª Drª Simone Cristina Motta - Laboratório de Neuroanatomia Funcional, ICB-USP (dados não publicados)

Neste esquema (3) uma das possibilidades de ativação do circuito sexualmente dimórfico pelo MeA, é a presença de um núcleo presente no leito da estria terminal (BST), especificamente a divisão principal do núcleo intersticial da estria terminal (BSTpr), (Canteras et al., 1995) que estaria fazendo uma ativação indireta desse circuito pois recebe densas inervações do MeA (Alheid e Heimer, 1988) e aferenta o circuito hipotalâmico sexualmente dimórfico (Dong e Swanson, 2004). Markhan e colaboradores (2009) mostraram que injeções de muscimol nesse núcleo diminuíram a expressão de comportamentos defensivos sociais em hamsters. Dessa forma é possível que os núcleos sexualmente dimórficos do hipotálamo estejam tonicamente inibidos pelo BSTpr e a ativação desses núcleos após a ativação do MeA seja devido a inibição exercida pelo MeA no BSTpr que, por sua vez, deixaria de inibir aqueles núcleos hipotalâmicos.

Entretanto é ilustrado na figura 3, que o MeA é um núcleo amigdalár eminentemente gabaérgico (Swanson e Petrovich, 1998) e, com isso, seria esperado que sua ativação levaria a inibição de seus alvos, isto é, seria esperado que após a ativação do MeA em comportamentos sociais, o circuito hipotalâmico sexualmente dimórfico estaria inibido e não ativado como observado em diferentes estudos.

## 1.6 Manipulação Gênica

A quimiogenética é um método de manipulação no qual as proteínas são projetadas para interagir com agentes químicos (Dar et al., 2012). Existe uma série de classes de proteínas que foram geneticamente modificadas, dessas diversas classes a mais comumente utilizada até o momento são os *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs* (DREADDs). Os DREADDs consistem em uma família de receptores muscarínicos acoplados a uma proteína G (GPCRs), capazes de modular *in vivo* esses receptores. Além disso, são moléculas modificadas para não serem ativadas por ligantes endógenos, apenas ao ligante sintético inerte N-óxido de Clozapina (CNO) (Roth, 2017). O CNO foi escolhido como ligante sintético pelas suas vantagens que facilitam o desenvolvimento dessa técnica, pois o seu composto de origem, a clozapina, possui alta afinidade aos receptores muscarínicos, então poucas mutações seriam necessárias para fazer do CNO um agonista potente. Ademais, a vantagem principal é que o CNO é uma molécula farmacologicamente inerte com baixa afinidade para outros receptores (Ambruster et al., 2007).

Essa técnica de manipulação gênica, tem sido amplamente utilizada para refinar o nosso conhecimento em relação a circuitaria neuronal por apresentar receptores de alta especificidade e na maior parte dos estudos é usado em ratos e camundongos. Curado (2017) modulou a atividade de neurônios motores do hipoglosso, por meio de DREADDs inibitórios, o qual permitiu regular sua atividade.

A literatura mostra uma diversidade de estudos com DREADDs associados a receptores Gq (proteína G excitatória) que sob efeito da CNO ocorre um aumento da excitabilidade neuronal (Alexander, et al., 2009; Krashes et al., 2011). Por sua vez, DREADDs acoplados à proteína Gi (proteína G inibitória) causaram silenciamento neuronal (Ferguson et al., 2011; Krashes et al., 2011). Por exemplo, Wang e colaboradores (2013), descreveu o condicionamento do medo em ratos que induziu a plasticidade neural robusta de sinapses excitatórias em neurônios inibidos por DREADDs (Gi), na subdivisão do núcleo central da amígdala.

## 1.7 Identidade química do MeA

É indiscutível a importância das estruturas do circuito sexualmente dimórfico na organização de comportamentos sociais complexos, devido às informações que elas integram, no entanto, de que forma o MeA está ativando essas estruturas hipotalâmicas é ainda desconhecido.

Seria possível que neurônios com outra identidade química, pouco observados anteriormente no MeA, sejam responsáveis por essa influência no circuito sexualmente dimórfico. Alguns trabalhos já descreveram a organização das projeções axonais das quatro partes reconhecidas no MeA e que este consiste em duas divisões principais: ventral e dorsal e que a segunda também pode consistir de regiões rostral e caudal (Canteras e col., 1995).

Wang e colaboradores (2017) afirmam que a porção posterior da amígdala (MeApd), possui neurônios gabaérgicos e glutamatérgicos, sendo a proporção de neurônios GABA duas vezes maior que de neurônios glutamatérgicos. Usando técnicas de vetores virais, o estudo propôs quantificar a proporção desses neurotransmissores que expressam GCaMP6, uma proteína fluorescente mediada por sinais de cálcio. A maioria dos neurônios que expressam GCaMP6 eram GABAérgicos, indicando que a maior parte das células do MeApd são do tipo inibitórias quando ativadas.

Utilizando dextranaminas biotinizadas (BDA), que são traçadores neuroanatômicos, Usunoff e colaboradores descreveram sobre as conexões eferentes em camundongos C57BL/6 do MeApd e MeApv que diferem em extensão e distribuição em relação aos estudos já mencionados em ratos. O trabalho também discute a importância e a falta de estudos com camundongos geneticamente modificados comparados com as descrições das conexões feitas em ratos.

Dessa forma, podemos observar que há uma carência de estudos em camundongos que descrevem os padrões de projeções amígdalares semelhantes ao que vemos em ratos. Levando em consideração a identidade química dessas conexões.

A fim de testar a existência de neurônios glutamatérgicos no MeA, buscamos realizar um estudo com camundongos transgênicos que só irão expressar a proteína Cre-recombinase em neurônios glutamatérgicos, favorecendo a identificação de células do glutamato em projeções anterógradas. O rastreamento neural utilizado em animais modificados geneticamente, já é uma técnica amplamente utilizada e se torna uma alternativa no estudo de circuitos neurais.

## **HIPÓTESE**

Nosso estudo anatômico possui um cunho exploratório, portanto não foi baseado em hipótese. Em relação ao estudo funcional trabalhamos com a hipótese de que o MeA é essencial para os comportamentos de defesa social, por levar informações olfatórias cruciais na identificação do co-específico. Dessa forma, a inibição do MeA levaria a diminuição da defesa.

## **OBJETIVOS**

Com todo o exposto, o presente trabalho visa:

- Identificar as projeções eferentes glutamatérgicas do MeA (Experimento 1).
- Observar o efeito da inibição do MeA durante a derrota social (Experimento 2).

## 2. MÉTODOS

### 2.1 Animais

**Estudo de mapeamento das projeções glutamatérgicas eferentes do MeA (Experimento 1)**- Foram utilizados camundongos machos e fêmeas *Vglut2-ires-Cre knockout* do *background C57BL/6* (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Esses animais têm expressões da enzima cre-recombinase direcionada para corpos celulares de neurônios glutamatérgicos excitatórios, sem interrupção da expressão do transportador 2 de glutamato vesicular. Podem ser usados para gerar mutações condicionais para estudo de ganho ou perda de função ou como no caso, mapeamento de neurônios glutamatérgicos. Os animais foram utilizados com idade entre 10 a 20 semanas com peso entre 20,0~30,0g em média. Mantidos no biotério do departamento institucional com condições controladas (temperatura, fotoperíodo e umidade relativa do ar) e com água e ração comercial *ad libitum*. Todas as manipulações previstas neste projeto foram aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do ICB – USP (CEUA # 58/2016).

**Estudo de inibição com farmacogenética na região do MeA envolvido no comportamento de defesa social (Experimento 2)** - Foram utilizados camundongos machos C57BL/6J (Biotério FMUSP, Rede de Biotérios USP) com idade entre 10 a 20 semanas, denominados como Intrusos para o experimento, com peso entre 20,0~30,0 g em média. Mantidos no biotério do departamento institucional com condições controladas (temperatura, fotoperíodo e umidade relativa do ar) e com água e ração comercial *ad libitum*. E camundongos machos e fêmeas da linhagem Swiss (Departamento de Farmacologia, ICB, USP) com idade entre 3 a 12 meses e peso entre 35,0~45,0 g em média, foram denominados como Residentes durante o experimento em nosso paradigma comportamental.

Os animais da linhagem Swiss foram mantidos em casais, um macho para uma fêmea, a fim de permitir a territorialidade inata do macho na gaiola moradia até o dia do teste.

Os animais foram mantidos em condições controladas (temperatura, fotoperíodo, umidade relativa do ar) e com água e ração comercial *ad libitum*. Todas as manipulações previstas neste projeto foram aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do ICB – USP (CEUA # 58/2016).

## 2.2 Vírus Adeno-associado (AAVs)

**Estudo de mapeamento das projeções glutamatérgicas eferentes do MeA (Experimento 1)** - Os vírus utilizados para este estudo, *AAV5-EF1A-DIO-HCHR2(H134R)-EYFP* ou *AAV5-EF1A-DIO-eNPHp3.0-EYFP*, são anterógrados. Foi injetado o mesmo volume viral de 15nl unilateralmente para ambos os vírus, no Núcleo Medial da Amígdala nas regiões anterodorsal (MeAad), anteroventral (MeAav) e posteroventral (MeApv). Estes vírus têm como característica ser dependente da enzima cre-recombinase e, portanto, só é expresso na presença de neurônios glutamatérgicos.

**Estudo de inibição com farmacogenética na região do MeA envolvido no comportamento de defesa social (Experimento 2)** - O vírus *AAV5-hSyn-hM4D(Gi)-mCherry* utilizado leva a expressão de um receptor metabotrópico sendo acoplado a uma proteína G inibitória sob o controle do promotor hSyn. Esse receptor é um *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs* (DREADDs) construído a partir de um receptor muscarínico M3 mutado. Esses receptores foram desenhados para serem ativados (excitação ou inibição) exclusivamente na presença de fármacos específicos não endógenos (Roth, 2016). Foram injetados primeiramente 70nl deste vírus e mais adiante ajustamos o volume para 50nl bilateralmente no MeA.

Todos os vírus utilizados foram obtidos por compra direta pelo Vector Core Services da Universidade da Carolina do Norte ou da empresa Addgene. E todos os AAVs previstos neste projeto apresentam titulação entre  $4 \times 10^{12}$  e  $6 \times 10^{12}$  partículas virais/ml.

## 2.3 Grupo experimental

Com base no delineamento experimental descrito anteriormente, propusemos os seguintes grupos experimentais:

Para a execução do estudo de mapeamento de projeções foram utilizados 27 animais (n=27) camundongos machos e fêmeas *Vglut2-ires-Cre* com no mínimo 12 semanas de idade. Que receberam injeções unilaterais de um vírus anterógrado:

**Grupo Anterógrado-** injeções do vetor viral: (*AV5-EF1A-DIO-HCHR2(H134R)-EYFP*) no MeA casos: GL28, GL29, GL30, GL36, GL37, GL38, GL39, GL40, GL41, GL44, GL45, GL46- (machos) e GL11, GL12, GL13, GL16, GL17, GL18, GL19, GL20 -(fêmeas);

E casos que receberam injeção do vetor viral: (*AAV5-EF1A-DIO-eNPHp3.0-EYFP*), casos: GL47, GL48, GL49, GL50-(machos) e GL22, GL23, GL24-(fêmeas).

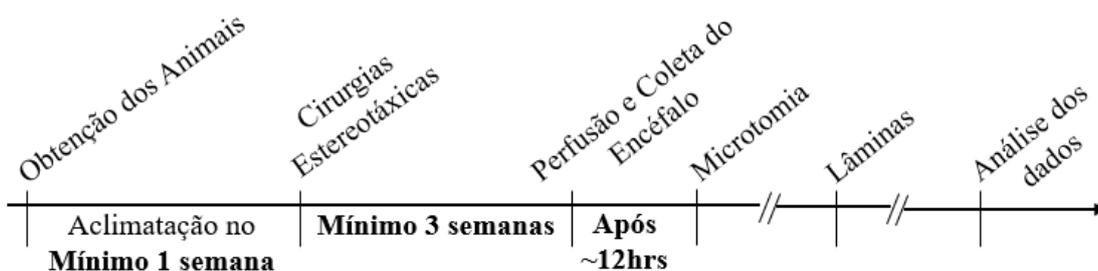
Para a execução do estudo de inibição farmacogenética nesse projeto, foram utilizados um total de 18 camundongos machos C57BL/6 (n=18) com no mínimo 12 semanas de idade. Divididos em 2 diferentes grupos: Grupo controle salina (n=8) e Grupo experimental CNO (n=10) nos quais foram feitos:

**Grupo CY-** injeções de vetores virais de DREADDs inibitórios (*AAV5-hSyn-hM4D(Gi)-mCherry*) no MeApd e pv, casos: A36,A37,A43,A44,A45,A46,A49,A50,A52,A53 (CYsalina) e A38,A39,A40,A41,A42,A47,A48,A51 (CYCNO).

## 2.4 Delineamento experimental

### Estudo de mapeamento das projeções glutamatérgicas eferentes do MeA (Experimento 1)

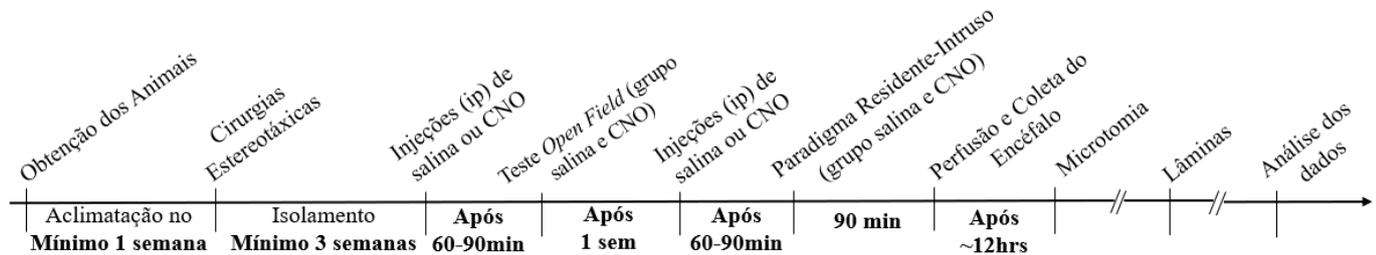
Cada grupo foi transfectado com os vírus anterógrados *AAV5-EF1A-DIO-HCHR2(H134R)-EYFP* / *AAV5-EF1A-DIO-eNPHp3.0-EYFP* na região do MeA. Após 3 semanas da cirurgia, com os animais já recuperados, esses foram perfundidos por via trans cardíaca e o material histológico foi separado para processamento. A linha do tempo mostra a sequência desses eventos:



**Estudo com inibição farmacogenética na região do MeA envolvidos no comportamento de defesa social (Experimento 2)** - Cada grupo foi transfectado com o vírus *AAV5-hSyn-hM4D(Gi)-mCherry* na região do MeA. No dia do teste, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p) uma concentração de 3% (3,0 mg/kg), em relação ao peso do animal, de N-óxido de clozapina (CNO; Tocris Bioscience, UK) para a inibição farmacogenética e de salina (0,9%) para os animais controles 1~1:30 hora antes de serem expostos ao paradigma Residente-Intruso. O CNO faz a ativação seletiva dos receptores (DREADDs) que são exclusivamente ativados por essa droga.

O grupo **CY** referente ao estudo de inibição farmacogenética é dividido em animais controle (**CYsalina**) e experimental (**CYCNO**), ambos expostos apenas uma vez ao paradigma. No dia do teste os animais **CYsalina** e **CYCNO** receberam injeções de salina e CNO respectivamente e após

90min iniciamos o teste. Dessa forma, esse experimento permitiu que os animais que receberam injeções de CNO fossem expostos a situação de intruso com a inibição temporária do MeA, uma vez que esse fármaco aparentemente possui uma meia vida de 6 horas *in vivo* em camundongos após a administração intraperitoneal (Bender et al.,1994). A linha do tempo mostra a sequência desses eventos:



## 2.5 Cirurgia Estereotáxica

Utilizamos o Atlas *The Mouse Brain in stereotaxic coordinates* (Franklin e Paxinos, 3ed. 2007) para nos auxiliar a atingir a região de interesse e assim dar início nas cirurgias. Para a injeção dos vetores virais, os animais foram anestesiados com Isoflurano (Isoforine, Cristália) por inalação. Logo após estes animais foram posicionados no estereotáxico e receberam, para o **Estudo de mapeamento**, em um primeiro momento injeções de 0,03 µl para depois passarmos para 0,015µl, do vírus *AV5-EF1A-DIO-HCHR2(H134R)-EYFP* e do vírus *AAV5-EF1A-DIO-eNPHp3.0-EYFP* no **Grupo Anterógrado**. Da mesma forma, para o **Estudo de Inibição farmacogenética**, os animais foram anestesiados e posicionados no estereotáxico e receberam 0,05 µl do volume de vírus nos grupos **CYsalina** e **CYCNO - AAV5-hSyn-hM4D(Gi)-mCherry** no MeA, bilateralmente.

De acordo com o experimento em questão, utilizamos uma seringa de vidro Neuros (Hamilton). E somente após no mínimo 21 dias da cirurgia, os animais passaram pelos experimentos, pois esse intervalo é necessário para a completa expressão do material genético inserido. Assim, os animais do **Estudo de inibição farmacogenética** denominados de **intrusos** foram expostos ao paradigma residente-intruso após esse intervalo.

Usamos como critério de exclusão a observação do sítio de injeção do vírus nas regiões do MeA, isto é, após o processamento do material e obtenção das imagens de cada caso, são excluídos os animais cuja fluorescência indica que a injeção mal localizada em relação ao núcleo em questão desejado.

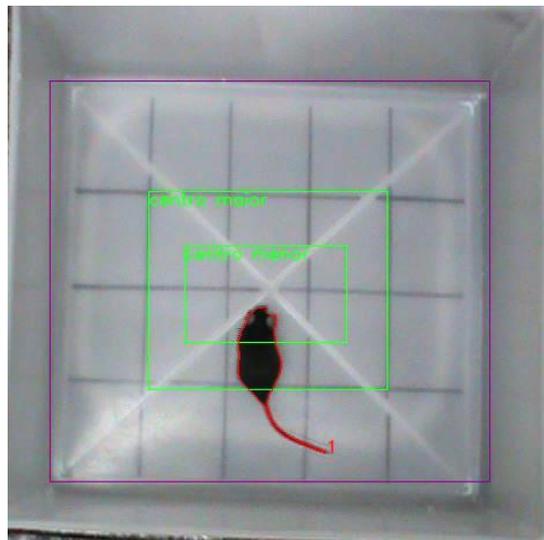
## Estudo com inibição farmacogenética na região do MeA envolvidos no comportamento de defesa social (Experimento 2):

### 2.6 *Open field* ou Teste de Campo Aberto

O Teste de Campo Aberto ou *Open field* tem como objetivo avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório do animal, podendo rastrear comportamentos ansioso e hiperatividade (Eilam, 2003).

O aparato utilizado consiste em uma caixa retangular (C 31cm x L 38,5cm x A 16cm), com o assoalho branco demarcado com linhas pretas dividindo a arena em setores periféricos e centrais para contabilizar qual região o animal permaneceu por mais tempo. A caixa possui paredes mais altas em relação ao animal para que o mesmo não tenha visão e não seja influenciado pelo ambiente externo a caixa (Figura 4).

**Figura 4:** Aparato para o teste de Campo Aberto (*Open field*).



Fonte: Imagem feita pelo autor durante a análise do comportamento.

Para a realização do teste o animal foi colocado no centro do aparato e ficou livre para explorar o ambiente durante 5 minutos. O teste foi realizado uma semana antes do Teste de Territorialidade e foi aplicado 1~1:30hora antes do teste somente aos animais do grupo CYsalina que recebeu i.p uma solução de salina (0,9%) e do grupo CYCNO, que recebeu i.p CNO com uma concentração de 3% (3,0 mg/kg) em relação ao peso do animal. Neste teste avaliamos os seguintes parâmetros: Distância percorrida em cm; Tempo de permanência na periferia; Tempo de permanência no centro da caixa e quantidade de bolos fecais.

Os dados foram filmados por uma Canon EOS 5DSR durante 5 min e após o teste os resultados das filmagens foram analisados pelo observador treinado utilizando o *software* de detecção de objetos e *tracking Detection of Object and Tracking Software* (Boris, Friard; Gamba, 2016).

## 2.7 Paradigma Residente–Intruso (Miczek,1979)

### 2.7.1 Aparato Experimental

O aparato experimental (Figura 5) consiste em uma caixa (30x20x13 cm) onde permaneceu um casal de camundongos da linhagem Swiss (Caixa do Residente) por no mínimo 3 semanas antes do teste. O chão das gaiolas foi coberto com serragem e limpo 2 vezes por semana. Após o 20º dia a serragem foi mantida até o dia do teste.

**Figura 5:** Caixa moradia do animal residente (co-específico).



Fonte: Imagem feita pelo autor durante o experimento do Paradigma Residente-Intruso

### 2.7.2 Teste de territorialidade

No 22º dia, imediatamente antes do teste, a fêmea foi retirada da gaiola moradia e foi introduzido um camundongo macho C57BL/6 intruso de acordo com o experimento proposto. Todos os testes foram filmados durante 5min a partir do primeiro ataque do residente, especificamente foi avaliado a duração em segundos do tempo total observado dos seguintes comportamentos, que mais pra frente serão detalhados: Defesa passiva: inclui comportamentos de defesa mais estáticos, como o freezing e o on-the-back. Defesa ativa: inclui comportamentos de defesa mais dinâmicos, com movimentação óbvia: fuga ou *flight*, o *up-right*, o *dashing away* e o *turning to face*. Exploração: comportamentos exploratórios com posturas desinibidas e não relacionadas diretamente à presença ou à agressividade do residente. Outros: categoria que inclui comportamentos como o *grooming*: auto-limpeza, quando o animal realiza movimentos com as patas anteriores e focinho, lambendo o corpo. E por fim, a investigação Social: comportamentos em que o intruso se engaja em manter algum

tipo de contato ou reconhecimento com o co-específico como investigação anogenital, cheirar e apoiar as patas no dorso do residente de forma desinibida. Cada teste comportamental é composto por 5 minutos de observação contados a partir do primeiro ataque do residente, como já mencionado e foram avaliados os comportamentos defensivos, sociais e exploratórios do intruso.

No dia do teste comportamental, todos os animais foram pesados e o volume calculado para recebimento exato da solução de uso (em  $\mu\text{l}$ ) em relação ao seu peso corporal. Os animais denominados intrusos do grupo **CYsalina** e **CYCNO** receberam i.p injeções de solução salina (0,9%) e de CNO (Tocris, Bioscience) (3,0mg/kg) respectivamente. Após 1~1:30hora iniciávamos o teste seguindo a ordem de aplicação.

### 2.7.3 Análise Comportamental do Animal Intruso

Os vídeos foram filmados com uma câmera Sony Handycam DCR-SR68 e por uma Canon EOS 5DSR durante 5 min, após o teste os dados foram analisados pelo observador treinado utilizando o *software* de análise etológica *Behavioral Observation Research Interactive Software* (Boris, Friard; Gamba, 2016). Foram analisados sete eventos de comportamento, no momento da exposição, baseado na descrição de Blanchard e colaboradores (1979):

#### 1-Defesa:

a-Passiva: *freezing* (períodos de congelamento) (Figura 6); *on-the-back* (animal permanece com o ventre para cima); *checking* (voltando-se a orientação em direção ao co-específico, a uma distância inferior a 5 cm).

**Figura 6:** Ilustração do comportamento defensivo “Freezing” (período de congelamento).



Fonte: Suemy Melim Yamada - Laboratório de Neuroanatomia Funcional, ICB-USP (dados não publicados) -Edição e publicação permitida pelo autor.

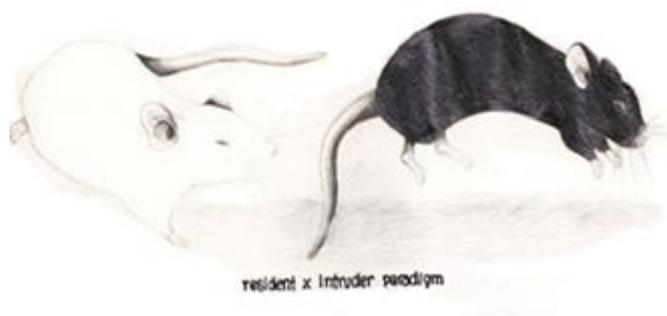
b-Ativa: *turning to face* (direcionar o olhar diretamente para o co-específico, a uma distância de 1 cm); *jumping* (saltos); *up-right* (animal apoia-se sobre as patas posteriores, mantendo as anteriores livres, realizando movimentos aparentemente reflexos de proteção da face frente aos ataques do co-específico) (Figura 7); *flight* (fuga) (Figura 8); *boxing* (ereto apoiado nos membros posteriores orientado para o oponente); *roll-tumble* (rolar durante o encontro agonístico);

**Figura 7:** Ilustração do comportamento defensivo "up-right"



Fonte: Suemy Melim Yamada - Laboratório de Neuroanatomia Funcional, ICB-USP (dados não publicados)- Edição e publicação permitida pelo autor.

**Figura 8:** Ilustração do comportamento defensivo *Flight* (fuga).



Fonte: Suemy Melim Yamada - Laboratório de Neuroanatomia Funcional, ICB-USP (dados não publicados)- Edição e publicação permitida pelo autor.

2- Social: *Sniffing* (cheirar diretamente o co-específico, a uma distância menor que 1 cm); cheirar a região anogenital

3- Exploração: Não-social (comportamentos relacionados à exploração do ambiente); cheirar a "saída" (com as patas apoiadas na caixa) (Figura 9); *rearing* (animal se mantém apoiado pelas patas posteriores e se levanta sem apoiar as patas dianteiras na caixa).

**Figura 9:** Ilustração do comportamento exploratório, cheirar a “saída”.



Fonte: Suemy Melim Yamada - Laboratório de Neuroanatomia Funcional, ICB-USP (dados não publicados)- Edição e publicação permitida pelo autor.

4-Outros: *feeding* (alimentar-se); *Grooming* (auto-limpeza)

5-Mordidas: Recebidas pelo intruso do residente (frequência de mordidas no intruso durante o ataque do residente) e Mordidas dadas pelo intruso no residente (frequência de mordidas do intruso no residente).

Os dados foram agrupados em medidas de tempo em segundos e frequência. Todos os dados comportamentais foram testados quanto à normalidade de distribuição.

#### **2.7.4 Análise Comportamental do Animal Residente**

A análise comportamental dos animais Residentes foi feita utilizando os mesmos métodos dos animais intrusos, porém agora a observação estava voltada para os animais Swiss, residentes da caixa moradia. Além disso, foram analisados dez eventos de comportamento, no momento do encontro social, baseado também na descrição de Blanchard e colaboradores (1979), eram esses:

1-Comportamentos de agressividade:

a- *Keep Down*: Manter o animal intruso no chão com o ventre voltado para cima;

b- *Move towards*: Ida de frente (em linha reta) em direção ao intruso

c- *Lateral threat*: Ida pela lateral em direção ao intruso

d- *Lateral attack*: Ataque lateral

e- *Upright posture*: Residente apoia-se sobre as patas posteriores, mantendo as anteriores livres, realizando movimentos aparentemente de ataque frente a presença do co-específico, podendo também o intruso se posicionar da mesma forma.

f- *Chase*: perseguição pelo intruso

2- Comportamento social:

a- *Social Sniffing*: Explorar se aproximando do intruso

3- *Inactivity* (inativo)

4- Mordidas dadas pelo residente no intruso (frequência de mordidas no intruso durante o ataque do residente).

Usamos como critério de exclusão o baixo resultado no comportamento agressivo do residente em relação às análises do grupo.

### 2.7.5 Análise Estatística

Os dados dos testes comportamentais obtidos foram submetidos à análise estatística para levantamento de sua relevância. O tamanho amostral foi baseado nos dados de trabalhos anteriores da pesquisa em questão (Motta et al., 2009). A análise estatística foi conduzida com o auxílio do programa *GraphPad Prism* (versão 5). A significância estatística da diferença entre os valores médios entre mais de duas medidas foi analisada pelo teste t de *Students* seguida do pós-teste de Newman-Keuls e assumiu-se o nível de significância de  $\alpha=5\%$  ( $p\leq 0,05$ ) para todas as normalidades de distribuição.

### 2.8 Perfusão

Para o **Estudo de Inibição farmacogenética**, 90 min após os testes comportamentais os animais foram perfundidos. Os animais que fizeram parte do **Estudo de Mapeamento** foram perfundidos após no mínimo 3 semanas após a cirurgia estereotáxica. Para a perfusão todos os animais receberam anestesia inalatória com Isoflurano (Isoforine, Cristália) e, em seguida, submetidos ao protocolo de perfusão por via transcardíaca, utilizando uma bomba peristáltica (Cole Parmer) inicialmente com 50ml de uma solução salina 0,9%, seguida de 150ml de uma solução fixadora de paraformaldeído 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 2 horas em uma solução fixadora com sacarose 20% a 4°C e em seguida foi passado para uma solução tampão de KPBS(0,02M) com sacarose 20% e armazenados a 4°C por no máximo 12 horas.

## 2.9 Microtomia e Histologia

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

Para esses animais foi separado cortes de encéfalos de uma das séries compartimentadas para observar a microscopia de fluorescência do vírus em questão e cortes de outra série para a imunohistoquímica e imunofluorescência.

## 2.10 Imuno-histoquímica

Para estudos neuroanatômicos, essa técnica é amplamente utilizada como uma ferramenta metodológica, porque através do uso de anticorpos, permite a identificação de antígenos em cortes histológicos do sistema nervoso (Bittencourt e Elias, 1999). A imunohistoquímica é principalmente indicada para localizar, *in situ*, células gliais ou neuronais produtoras de determinado peptídeo, incluindo corpo celular e ramificações axonais. Neste estudo utilizamos essa técnica para amplificar o sinal de traçadores neuronais da proteína fluorescentes GFP (green fluorescence protein), tornando essas marcações permanentes.

Da mesma forma para o estudo funcional, utilizamos o processamento imuno-histoquímico para detecção de células de Fos, um marcador de atividade neural, para revelar o local de ativação dos núcleos que fazem parte da organização do comportamento de defesa social. Com isso, foram feitas 6 seções de 5 min para lavagens em KPBS (0,02M) a fim de se remover a solução anticongelante, em seguida os cortes foram incubados em uma solução com 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em KPBS (0,02M) por 30 min. Após esse período os cortes seriados foram lavados em 6 seções de 5 min e em seguida incubados em uma solução de tampão fosfato de potássio KPBS (0,02M) contendo triton X-100 a 0,3%, soro normal de cabra a 2% e anticorpo anti-Gfp (Abcam) numa diluição de 1:20.000µl (Tabela 1), sob agitação constante, a 4°C, durante 72 horas. O complexo antígeno-anticorpo foi

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 biotilado anti-IGg de coelho, feito em cabra (Vector Laboratories), numa diluição de 1:200 $\mu$ l, 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 $\mu$ l (Tabela 1), por 1 hora e 30 minutos. Na reação da imunoperoxidase, para a revelação do complexo antígeno-anticorpo foi utilizado basicamente o protocolo de Itoh e colaboradores (1979). Resumidamente, os cortes foram incubados em uma solução de tampão fosfato de sódio 0,1M contendo 50mg de tetrahidrocloreto de 3-3' diaminobenzidina-DAB (Sigma), 2ml de uma solução aquosa de sulfato de níquel a 10% e 40mg de cloreto de amônia em 100ml, por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,1g de  $\beta$ -D-glicose (Sigma) diluído em 1ml de água milli-Q e a reação foi interrompida 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.).

Tabela 1- Concentração dos Anticorpos durante a incubação no processamento imunohistoquímico

| <b>Proteína</b> | <b>Anticorpo Primário</b>      | <b>Diluição</b> | <b>Anticorpo Secundário</b>         | <b>Diluição</b> | <b>Conjugado</b> | <b>Fabricação</b>          |
|-----------------|--------------------------------|-----------------|-------------------------------------|-----------------|------------------|----------------------------|
| EYFP            | <i>Made in Rabbit anti-Gfp</i> | 1:10.000        | <i>Made in Goat Anti-IGg-Rabbit</i> | 1:200           | Biotilado        | <i>Vector Laboratories</i> |
| FOS             | <i>Made in Rabbit anti-Fos</i> | 1:1000          | <i>Made in Goat Anti-IGg-Rabbit</i> | 1:200           | Biotilado        | <i>Vector Laboratories</i> |

## 2.11 Imunofluorescência

Para detecção da proteína Fos por imunofluorescência foi utilizado o protocolo baseado em Marín-Blasco et al (2017). Foram feitas 6 seções de 5 min para lavagens em KPBS (0,02M) a fim de se remover a solução anticongelante, em seguida os cortes foram incubados em uma solução com anticorpo primário anti-Fos feito em coelho (PC38, Calbiochem, 1:10.000) em concentração de 1:1000 $\mu$ l (Tabela 2), em um soro Bovine Serum Albumin (BSA) diluído em KPBS(0,02M)-solução de bloqueio e triton X-100, por 48hrs a 4 °C. Os cortes foram lavados novamente em KPBS(0,02M) e incubados em anticorpo secundário conjugado a um fluorocromo (Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit

IgG (H+L), Invitrogen) em concentração 1:500 $\mu$ l (Tabela 2) acompanhado da mesma solução com soro BSA e triton X-100, durante 2hr em temperatura ambiente. Após este período, os cortes foram lavados em KPBS(0,02M) e montados em lâminas gelatinizadas para secarem.

Em seguida os cortes foram imergidos em uma solução de DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) que é um corante fluorescente que se liga seletivamente ao DNA de fita dupla e forma complexos DNA-DAPI fortemente fluorescente com alta especificidade (Kazemiha, 2015). É comumente utilizado para detectar microplasma em cultura de células por microscopia de fluorescência. Visamos usar essa técnica para evidenciar a organização citoarquitetônica da região de interesse, durante 10 min e por fim, as lâminas foram cobertas usando um meio de montagem de base aquosa (Fluoromount, Sigma-Aldrich).

Tabela 2- Concentração dos Anticorpos durante a incubação no processamento de imunofluorescência

| Proteína | Anticorpo Primário      | Diluição | Anticorpo Secundário       | Diluição | Conjugado       | Fabricação                  |
|----------|-------------------------|----------|----------------------------|----------|-----------------|-----------------------------|
| FOS      | Made in Rabbit anti-FOS | 1:1000   | Goat anti-Rabbit IGg (H+L) | 1:500    | Alexa Fluor 488 | PC38, Calbiochem Invitrogen |

## 2.12 Contagem da densidade celular e análise estatística

Os dados obtidos pelas imagens capturadas pelo microscópio eletrônico nos possibilitaram contar a densidade celular das células marcadas pela proteína Fos, pelos métodos imuno-histoquímico e imuno-fluorescentes. O programa utilizado para contabilizar as células foi o *Image J (National Institute of Health)* e após as contagens de células de Fos, a análise estatística foi conduzida com o auxílio do programa *GraphPad Prism (versão 5)*. A significância estatística da diferença entre os valores médios entre mais de duas medidas foi analisada pelo teste t de *Students*.

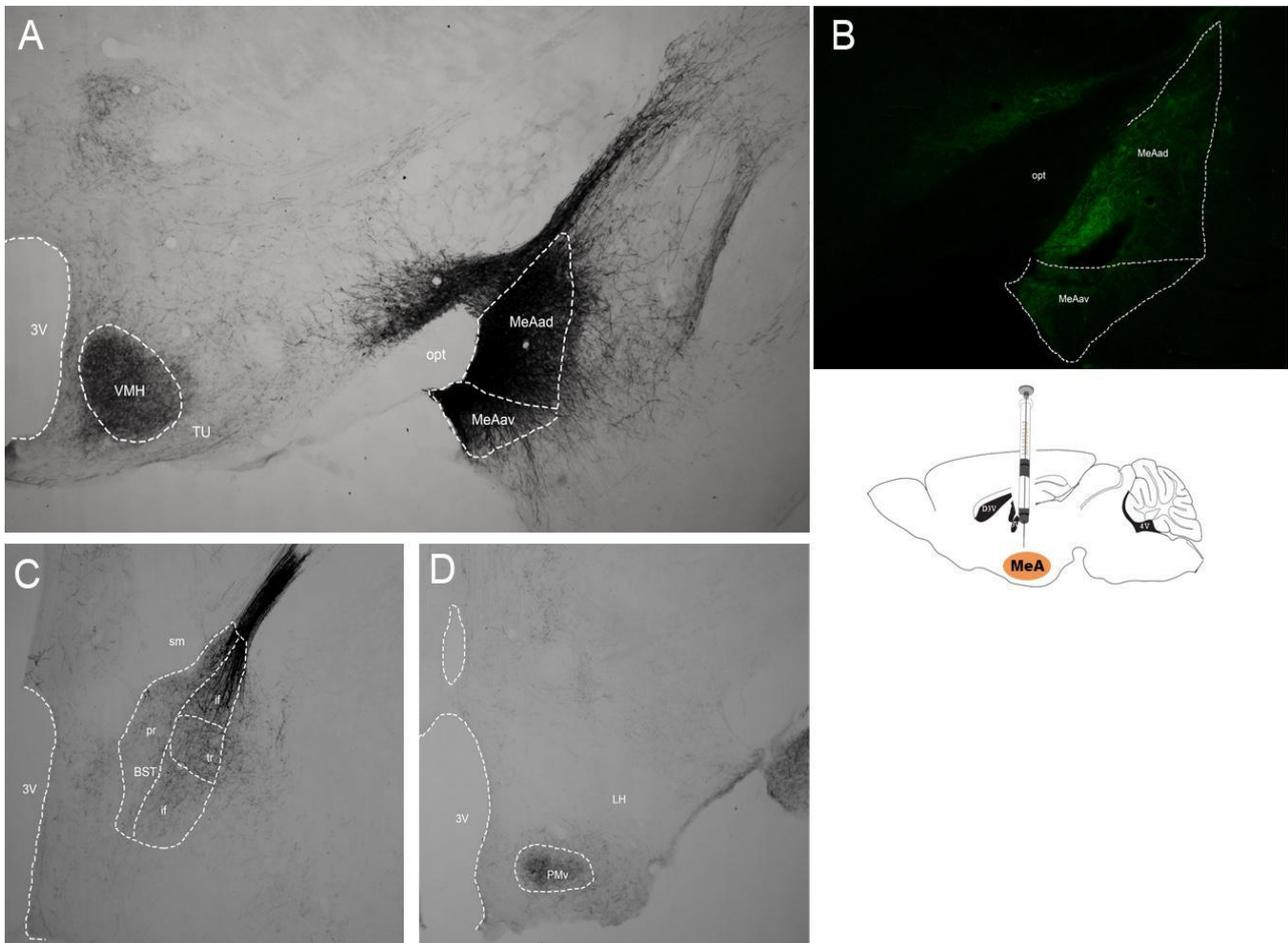
## 3. RESULTADOS

### 3.1 Estudo de mapeamento das projeções glutamatérgicas eferentes do MeA

Neste experimento, os animais *Vglut2-ires-Cre* (n=27) foram transfectados com um vírus cre-dependente anterógrado, esse vírus expressa a proteína fluorescente GFP. Destes, foram 16 machos e 11 fêmeas que receberam o vírus *AAV5-EF1A-DIO-HCHR2(H134R)-EYFP* e 4 machos e 3 fêmeas que receberam do vírus *AAV5-EF1A-DIO-eNHP3.0-EYFP* todos nas subregiões do MeA unilateralmente. A figura 10 demonstra as projeções eferentes glutamatérgicas do MeA, parte

anterodorsal (MeAad) em um camundongo macho *Vglut2-ires-Cre*, onde a figura 10A representa a reação imunohistoquímica no sítio de injeção apresentado pela fluorescência do vírus (figura 10B), projeções para o VMH parte anterior; densas projeções para o PMv (10C) e para o BST (10D).

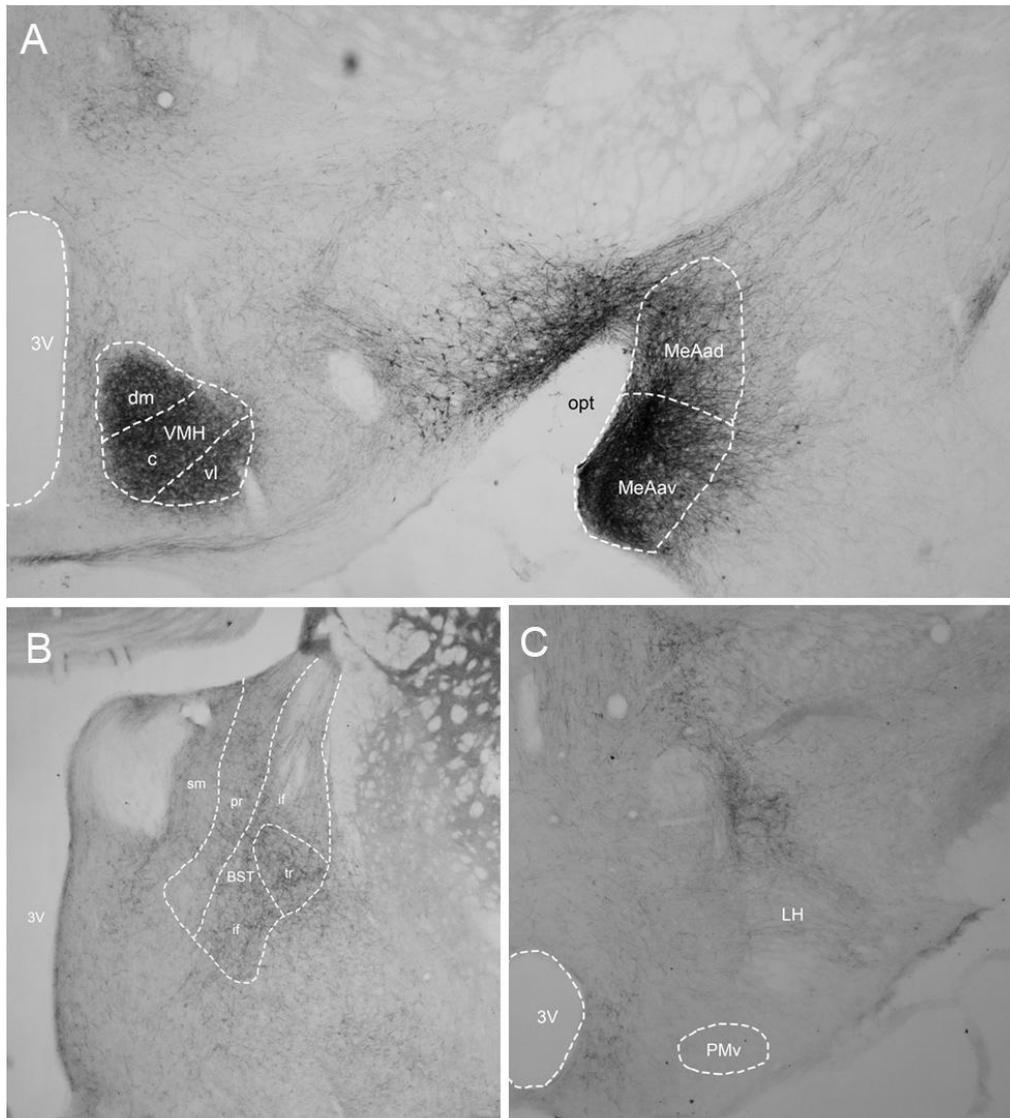
**Figura 10:** Fotomicrografia de corte frontal (40 $\mu$ m) de camundongo macho *V-Glut2Cre* (caso GL13-macho) transfectado com o vírus AV5-EF1A-DIO-HCHR2(H134R)-EYFP na região do MeAad.



Cortes Imunorreagidos com anticorpo anti-GFP: A- local de injeção no MeAad , com projeções para o VMH; B- Fotomicrografia mostrando a fluorescência no local da injeção. C- Projeções densas para o PMv; D- região de projeção para o BST. Abreviaturas: 3V- terceiro ventrículo; BST- núcleo da estria terminal;if- parte interfascicular; pr- parte principal; tr- parte transversa; MeAad- núcleo medial da amígdala parte anterodorsal; MeAav- núcleo medial da amígdala parte anteroventral; opt- trato óptico; PMv- núcleo pré-mamilar ventral; sm -estria medular; VMH- núcleo ventromedial do hipotálamo; TU- núcleo tuberal.

Da mesma forma a figura 11 mostra projeções eferentes glutamatérgicas, com o sítio de injeção agora localizado na região anteroventral do MeA (MeAav), indicado na figura 11C com projeções para o VMH (11A), para o BSTpr/tr/if (11B) e fracas projeções para o PMd (11D).

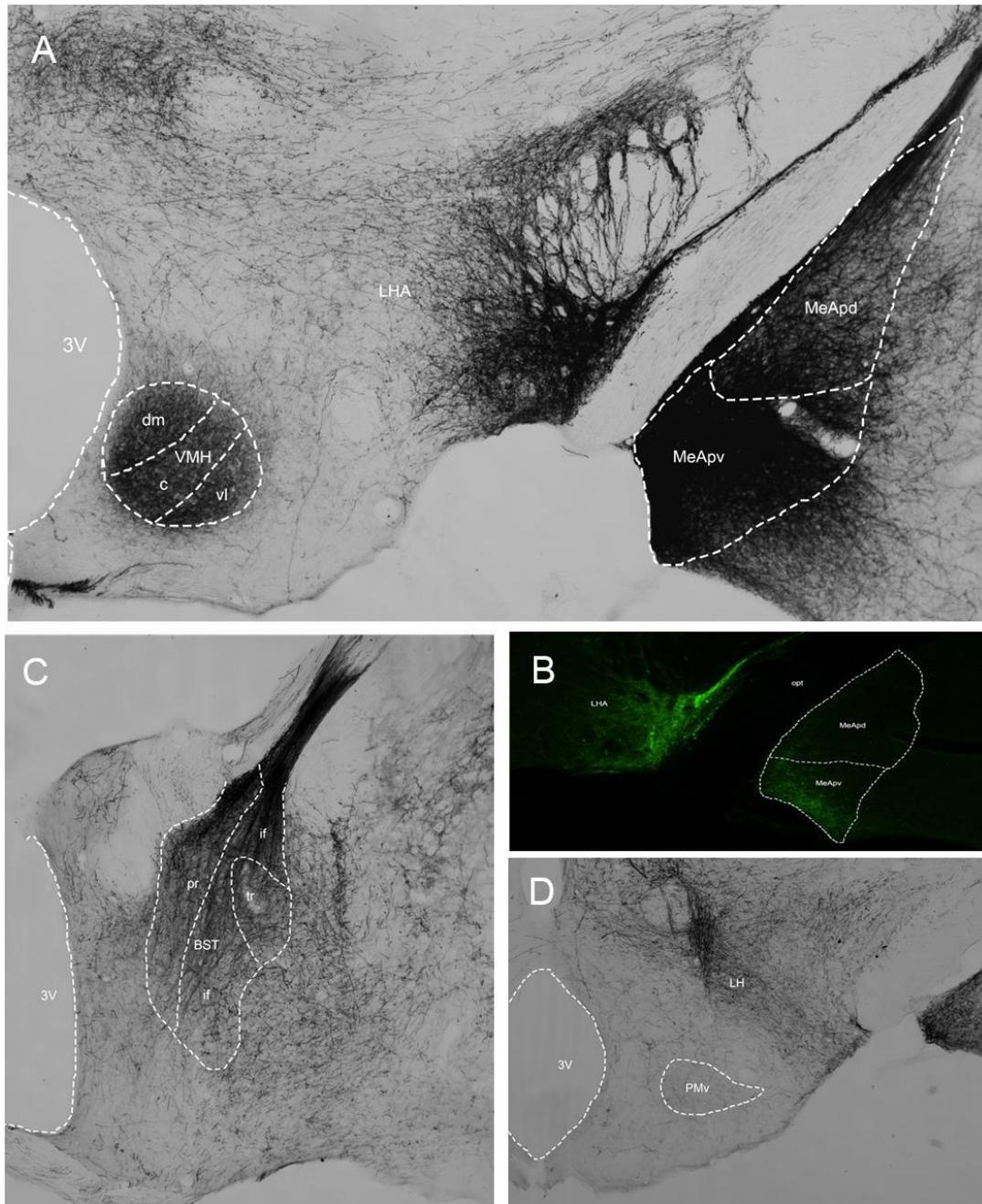
**Figura 11:** Fotomicrografia de corte frontal (40 $\mu$ m) de camundongo macho *V-Glut2Cre* (caso GL48-macho) transfectado com o vírus *AAV5-EF1A-DIO-eNPHp3.0-EYFP* na região do MeAav.



Cortes Imunoreagidos com anticorpo anti-GFP: A- local de injeção no MeAav, com projeções para o VMH; B- região de projeção para o BST; C- Fotomicrografia mostrando a fluorescência no local da injeção; D- Projeções fracas para o PMd; Abreviaturas: 3V- terceiro ventrículo; BST- núcleo da estria terminal; if- parte interfascicular; pr- parte principal; tr- parte transversa; MeAad- núcleo medial da amígdala parte anterodorsal; MeAav- núcleo medial da amígdala parte anteroventral; opt- trato óptico; PMv- núcleo pré-mamilar ventral; sm-estria medular; VMH- núcleo ventromedial do hipotálamo; dm- parte dorsomedial; c- parte central; vl- parte ventrolateral.

Neste caso na figura 12, podemos observar a infecção do vírus anterógrado *AAV5-EF1A-DIO-HCHR2(H134R)-EYFP*, em uma fêmea, em porções restritas do MeA parte posteroventral (MeApv), como ilustrado na figura 12C o sítio de injeção marcado pela fluorescência do vírus. Bem como, projeções predominantemente para o VMHc/vl (12A), também para o BST (12B) e fracas projeções para o PMd e PMv (12D).

**Figura 12:** Fotomicrografia de corte frontal de camundongo fêmea *V-Glut2Cre* (caso GL18-fêmea) transfectado com o vírus AV5-EF1A-DIO-HCHR2(H134R)-EYFP na região do MeApv.

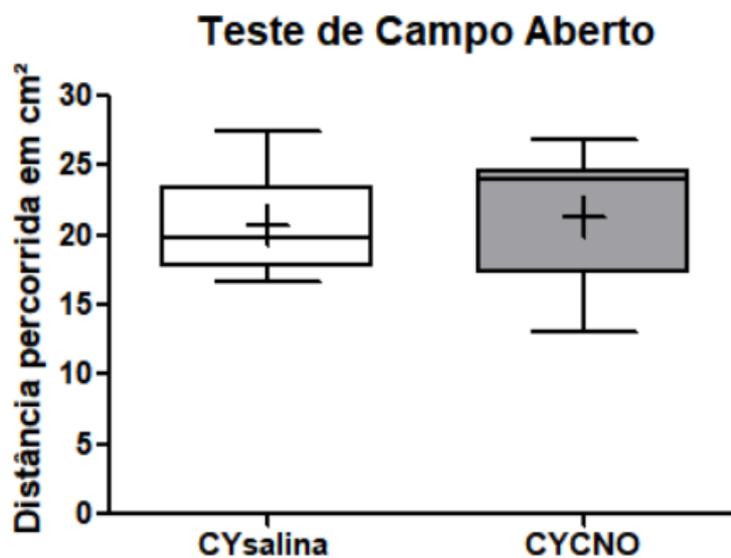


Cortes Imunoreagidos com anticorpo anti-GFP: A- na região destaque, local de injeção no MeApv, com projeções para o VMHdm/vl; B- Projeção para o BST; C- Fotomicrografia mostrando a fluorescência no local da injeção; D- região de projeção para o PMd e PMv. Abreviaturas: 3V- terceiro ventrículo; BST- núcleo da estria terminal parte principal; if- parte interfascicular; pr- parte principal; tr- parte transversa; MeApd- núcleo medial da amígdala porção posterodorsal; MeApv- núcleo medial da amígdala porção posteroventral; opt- trato óptico; PMV- núcleo pré-mamilar ventral; VMH- núcleo ventromedial do hipotálamo; dm- parte dorsomedial; c- parte central; vl- parte ventrolateral.

### **3.2 Estudo com inibição farmacogenética na região do MeA envolvidos no comportamento de defesa social**

#### **3.2.1 Teste de Campo Aberto (*Open Field*)**

Os resultados do teste de Campo Aberto estão apresentados nos gráficos a seguir. Como podemos observar, a manipulação viral no núcleo do MeA por meio da inibição quimiogénética não alterou a capacidade locomotora desses animais, que receberam injeções de CNO (grupo CYCNO), quando comparados com os animais controles. Os dados foram comparados entre distância (cm<sup>2</sup>) (Gráfico 1); tempo de permanência no centro do aparato e tempo de permanência na periferia (Gráfico 2). Além disso, foi feita a contagem de bolos fecais durante o teste e os resultados contabilizados não apresentaram diferença estatística entre os grupos (dados não apresentados).



**Gráfico 1-** Distância percorrida em centímetros quadrados dos animais experimentais (CNO n=10) e controles (salina n=8) durante o teste de campo aberto. Dados expressos em média±EP,  $Pvalue(0,8549)$ ,  $t= 0,2817$   $df= 15$  ns, ( $p<0,05$ ).

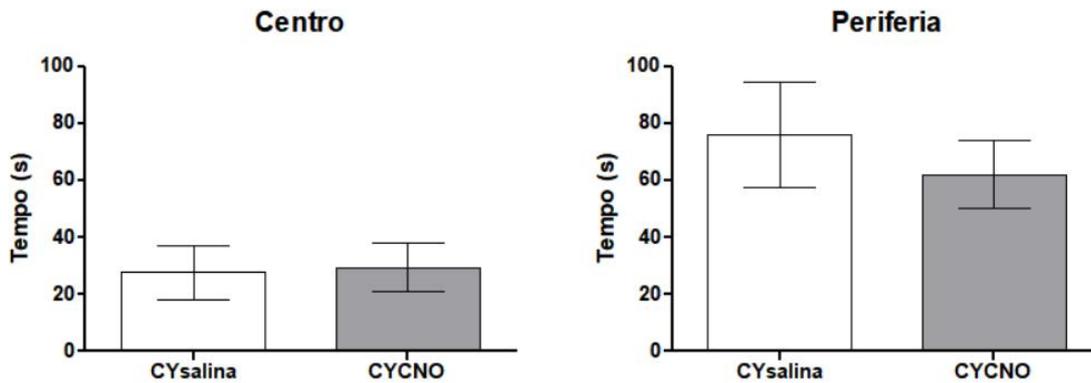


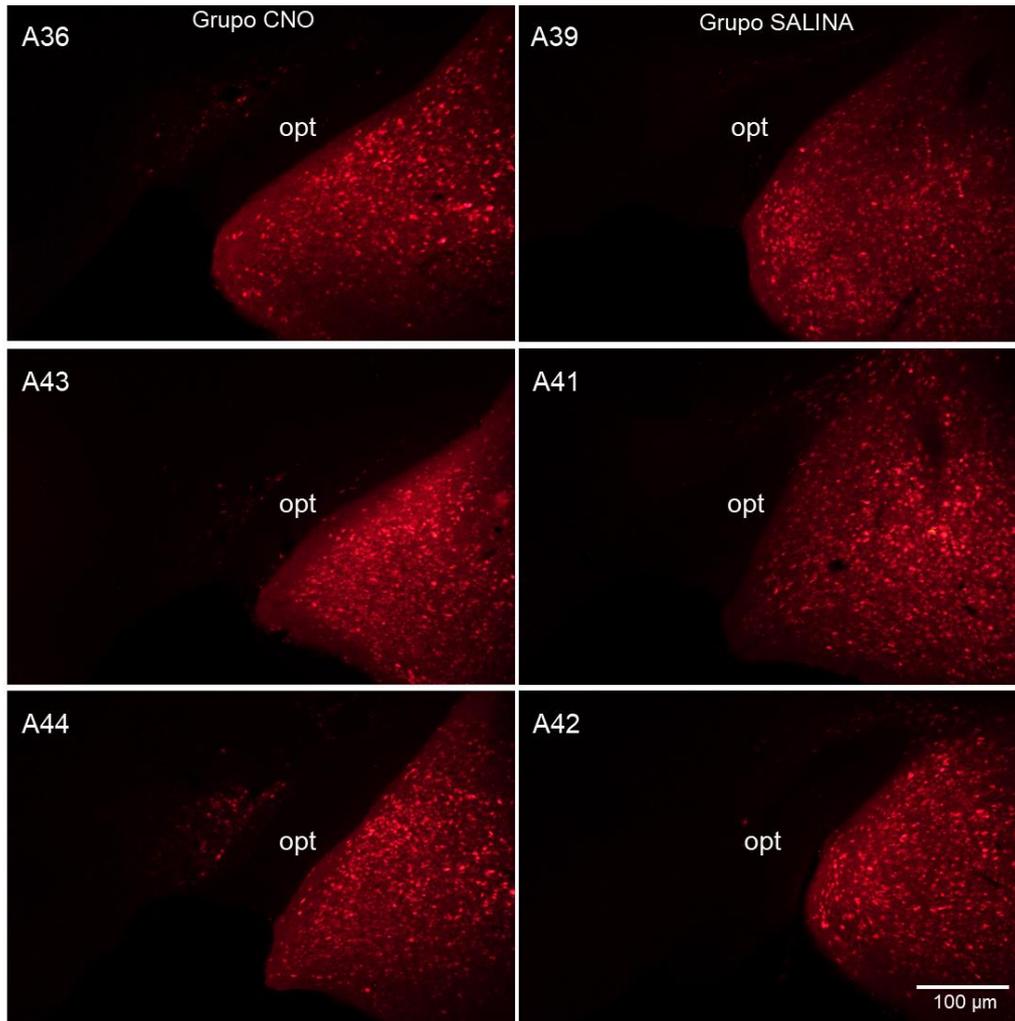
Gráfico 2-

Contagem do tempo em segundos gasto no centro ou na periferia durante o teste de campo aberto dos animais experimentais (CNO) e controles (salina). Dados expressos em média $\pm$ EP,  $Pvalue(0,8909)$ ,  $t=0,1396$ ,  $df=14$  ns, ( $p<0,05$ ).

### 3.2.2 Histologia e Testes comportamentais

Nos **Grupos CYSalina e CYCNO** foi realizado a transfecção do vírus inibitório *AAV5-hSyn-hM4D(Gi)-MCherry*, que foi capaz de infectar de forma satisfatória nossa região de interesse. A figura 12 mostra casos selecionados que foram expostos ao teste comportamental. Estão situados do lado esquerdo os casos que receberam injeções (ip) de CNO (Grupo CYCNO) e do lado direito casos que receberam injeções de salina (Grupo CYSalina). Para efeito de demonstração, colocamos o lado direito do corte histológico de todos os animais.

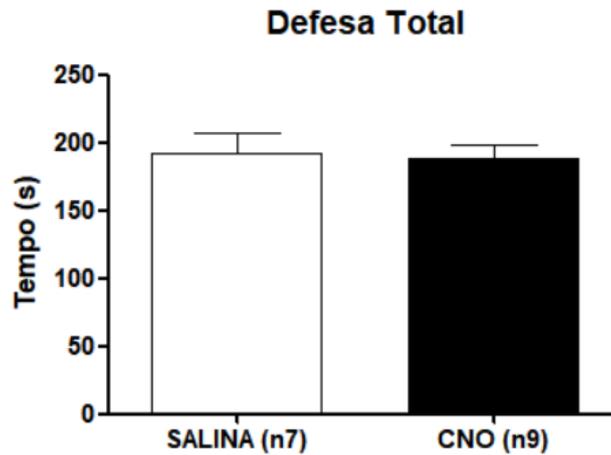
**Figura 13:** Fotomicrografia de corte frontal (40 $\mu$ m), sítio de injeção.



Corte frontal, lado direito, de camundongos machos C57BL/6J (casos A36, A43, A44, A39, A41, A42) mostrando o local de injeção por DREADDs inibitório (*AAV5-hSyn-hM4D(Gi)-MCherry*) no MeA, aumento de 10X. Abreviaturas: opt-trato óptico.

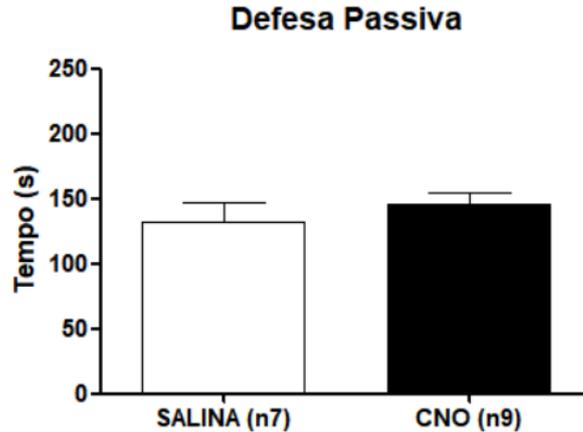
**Resultado comportamental do Grupo CYsalina e CYCNO** - Os animais foram expostos a um dia de teste comportamental, permitindo a avaliação da expressão da proteína Fos e dos comportamentos emitidos durante o estresse social com a inibição do MeA. Abaixo, os gráficos mostram a distribuição das médias e as análises estatísticas de cada parâmetro analisado.

O gráfico 3 demonstra a somatória dos comportamentos de defesa passiva e de defesa ativa resultando na defesa total (tempo em segundos) analisada durante a exposição ao co-específico dominante. Não obtivemos diferença estatística entre as médias dos grupos analisados.



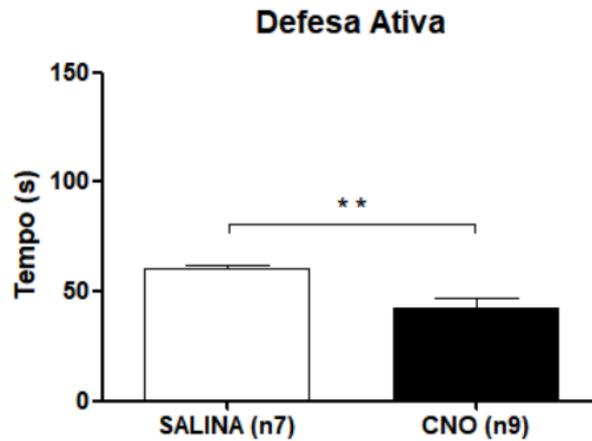
**Gráfico 3-** Efeito de uma exposição ao paradigma Residente-Intruso no tempo gasto em segundos dos comportamentos de defesa passiva somado ao de defesa ativa resultando em defesa total do grupo CYCNO: animais com inibição do MeA e CYSalina: animais sem a inibição do MeA. Dados expressos como média±EP.  $Pvalue(0,8096)$  ns ( $p<0.05$ ),  $t=0,2456$ ,  $df=14$ .

O gráfico 4 mostra a análise dos comportamentos agrupados em defesa passiva. Não houve diferença estatística nas médias entre os grupos.



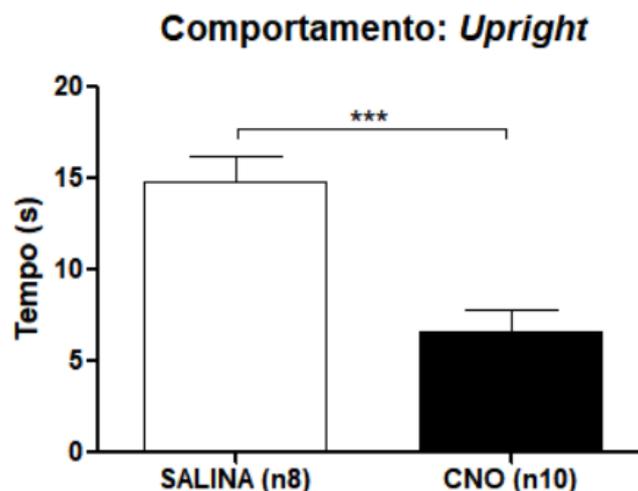
**Gráfico 4-** Efeito de uma exposição ao paradigma Residente-Intruso no tempo gasto em segundos no comportamento de defesa passiva no grupo CYCNO: animais com inibição do MeA e Salina: animais sem a inibição do MeA. Dados expressos como média±EP.  $Pvalue(0,4349)$  ns ( $p<0.05$ ),  $t=0,8039$ ,  $df=14$ .

Em relação aos comportamentos agrupados em defesa ativa, a análise dos dados mostrou uma diferença significativa entre as médias, o gráfico 5 aponta essa diferença.



**Gráfico 5-** Efeito de uma exposição ao paradigma Residente-Intruso no tempo gasto em segundos no comportamento de defesa ativa no grupo CY. CNO: animais com inibição do MeA e Salina: animais sem a inibição do MeA. Dados expressos como média±EP. Pvalue (0.0078) \*\*diferença estatisticamente significativa ( $p<0.05$ ),  $t=3,103$ ,  $df=14$ .

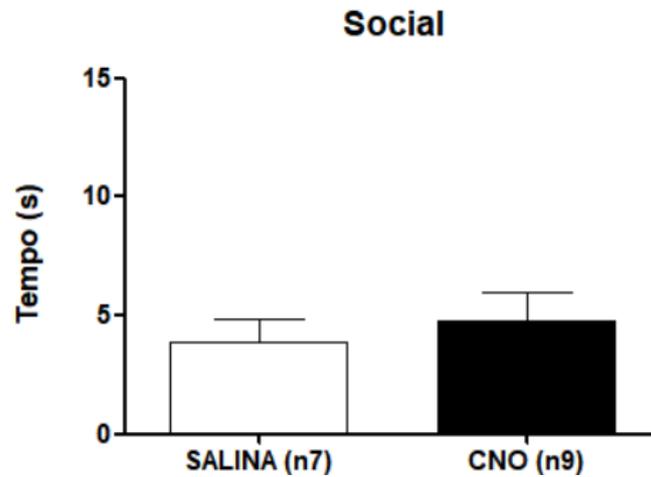
Dentre os comportamentos classificados como defesa ativa, vimos que o *upright* foi um componente que influenciou na diferença entre as médias dos grupos. O gráfico 6 mostra particularmente os dados desse comportamento nos grupos controle e experimental.



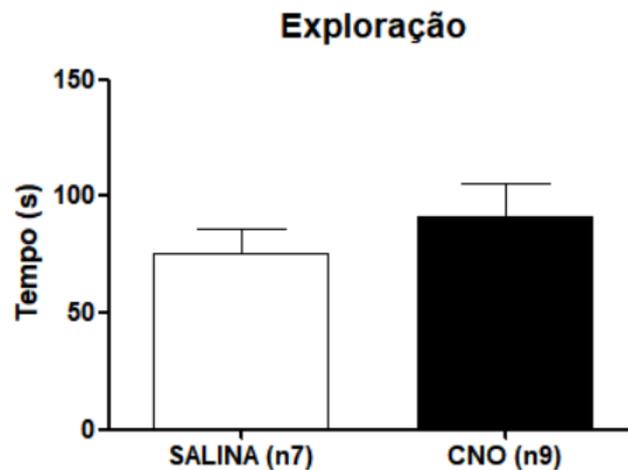
**Gráfico 6-** Efeito de uma exposição ao paradigma Residente-Intruso no tempo gasto em segundos no comportamento seletivo de *upright* no grupo CY. CNO: animais com inibição do MeA e Salina: animais que receberam injeções i.p de salina anteriormente à exposição da derrota social. Dados expressos como média±EP. Pvalue(0.0004) \*\*\*diferença estatisticamente significativa ( $p<0.05$ ),  $t=4,588$   $df=14$ .

Os gráficos 7, 8 e 9 mostram, respectivamente, as médias de tempo gasto (s), erros e análise estatísticas dos comportamentos sociais, exploratórios e outros obtidas nos grupos experimental e

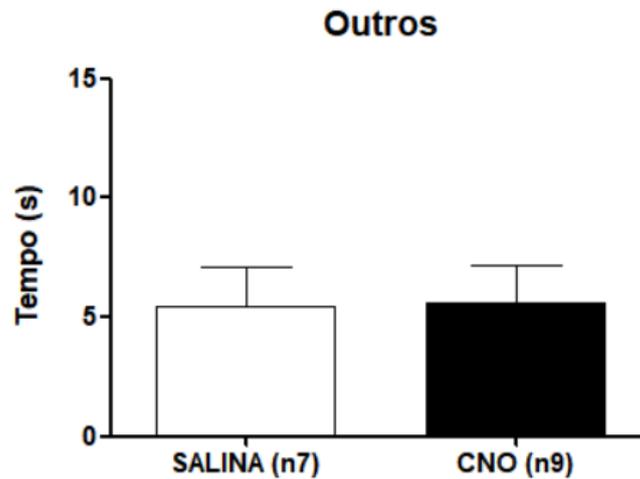
controle durante a exposição ao co-específico dominante. Não obtivemos diferença estatística entre as médias dos grupos analisados.



**Gráfico 7-** Efeito de uma exposição ao paradigma Residente-Intruso no tempo gasto em segundos no comportamento social no grupo CY. CNO: animais com inibição do MeA e Salina: animais sem a inibição do MeA. Dados expressos como média±EP.  $Pvalue(0,6042)$  ns ( $p<0.05$ ),  $t=0.5303$ ,  $df=14$ .



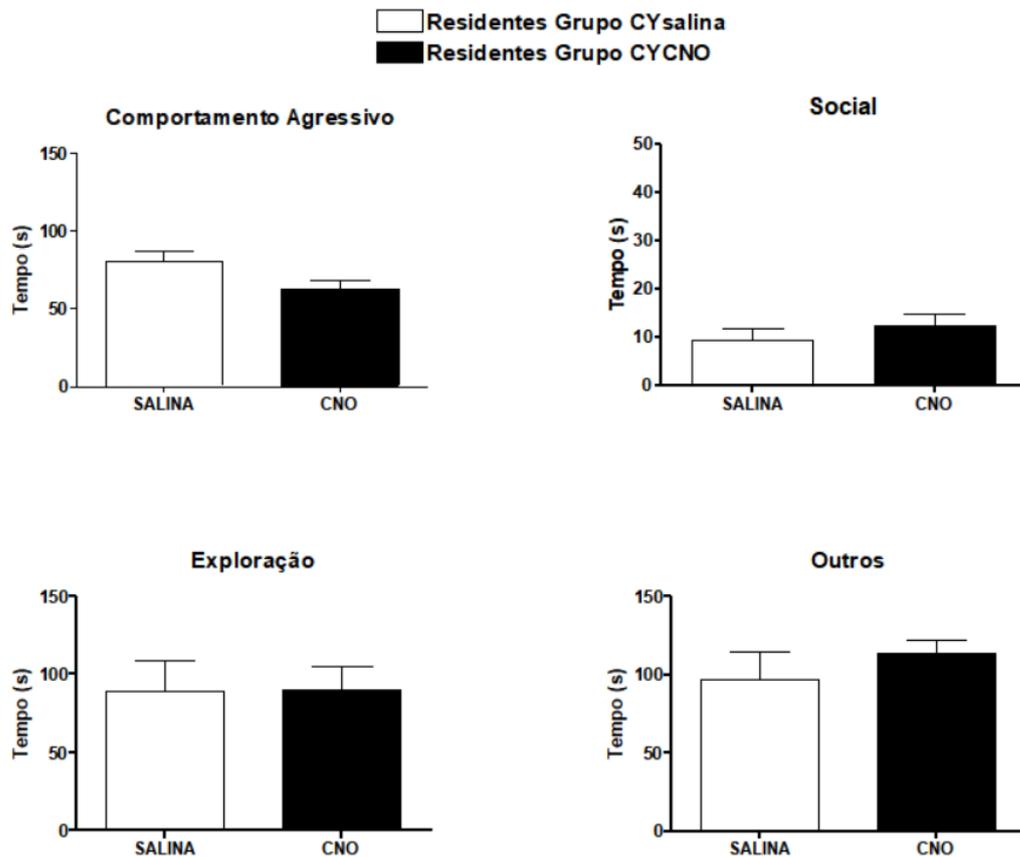
**Gráfico 8-** Efeito de uma exposição ao paradigma Residente-Intruso no tempo gasto em segundos no comportamento exploratório no grupo CY. CNO: animais com inibição do MeA e Salina: animais sem a inibição do MeA. Dados expressos como média±EP.  $Pvalue(0,4188)$  ns ( $p<0.05$ ),  $t=0,8331$ ,  $df=14$ .



**Gráfico 9-** Efeito de uma exposição ao paradigma Residente-Intruso no tempo gasto em segundos no comportamento categorizado como outros no grupo CY. CNO: animais com inibição do MeA e Salina: animais sem a inibição do MeA. Dados expressos como média±EP. *Pvalue*(0,9356) ns ( $p < 0.05$ ),  $t = 0,08222$ ,  $df = 14$ .

### **Resultado comportamental dos animais Residentes**

A análise comportamental dos Residentes de ambos os grupos **CYCNO** e **CYsalina** foi realizada como critério de exclusão para descartar situações em que o desempenho do animal dominante era baixo em relação ao grupo e não estimulava o comportamento de defesa do animal intruso durante o teste comportamental. Da mesma forma, essa análise nos ajuda a descartar a possibilidade da alteração vista no comportamento dos intrusos do grupo experimental em relação ao grupo controle ser em decorrência de uma menor expressão de comportamento agressivo pelo residente. O gráfico 10 mostra a distribuição das médias, indicando que não houve diferença significativa entre o comportamento do residente no grupo experimental e no grupo controle.

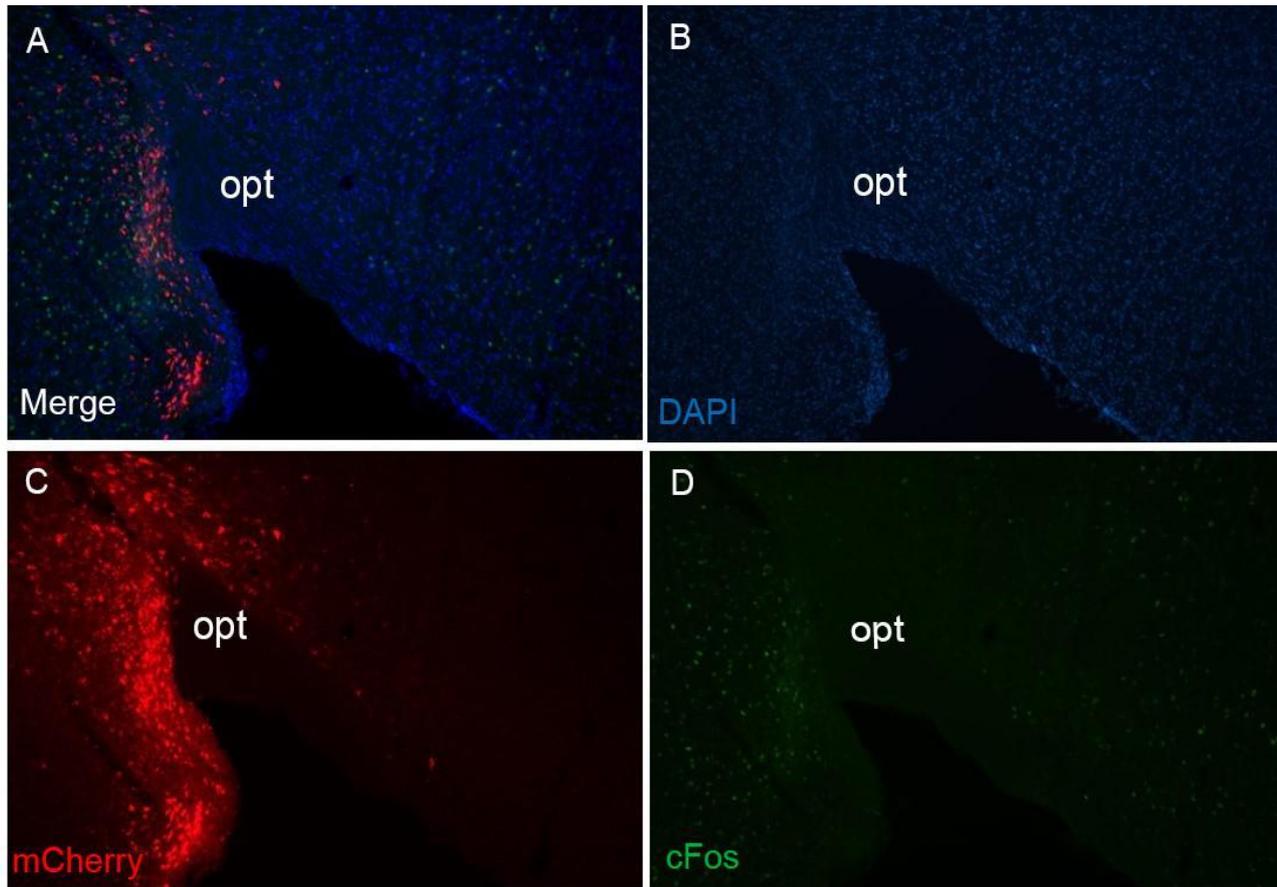


**Gráfico 10-** Análise comportamental dos animais residentes do grupo CY durante o teste. Grupo CYCNO(n9) são os dados dos residentes frente ao intruso que receberam injeções de CNO antes da exposição ao paradigma e grupo CYsalina(n7) são os dados dos residentes frente ao intruso que receberam injeções de salina antes da exposição. Comportamento agressivo *Pvalue* (0,0519),  $t=2,125$ ,  $df=14$ ; Social *Pvalue* (0,4302)  $t=0,8123$ ,  $df=14$ ; Exploração *Pvalue* (0,9810),  $t=0,02429$ ,  $df=14$ ; Outros *Pvalue* (0,3679),  $t=0,9305$ ,  $df=14$ . Dados expressos como média $\pm$ EP, ns ( $p<0,05$ ).

### 3.3 Imunofluorescência

Após as análises comportamentais, utilizamos a técnica de imunofluorescência para observar a atividade neuronal através da expressão da proteína Fos, nos animais que passaram pela exposição ao paradigma. A figura 13 mostra um animal infectado com o vírus *AAV5-hSyn-hM4D(Gi)-MCherry* no MeA que recebeu injeções (ip) de salina. Temos (Figura 13C) células expressando o gene repórter especificamente na região do MeAad/av, com isso, uma quantidade significativa de células expressou a proteína Fos após a derrota social (figura 13D). É possível observar células com dupla marcação Fos/mCherry (Figura 13A) indicando que essas células estavam ativadas durante o teste mesmo com a infecção viral pois os receptores de DREADDs não estavam ativados e o núcleo não sofreu inibição.

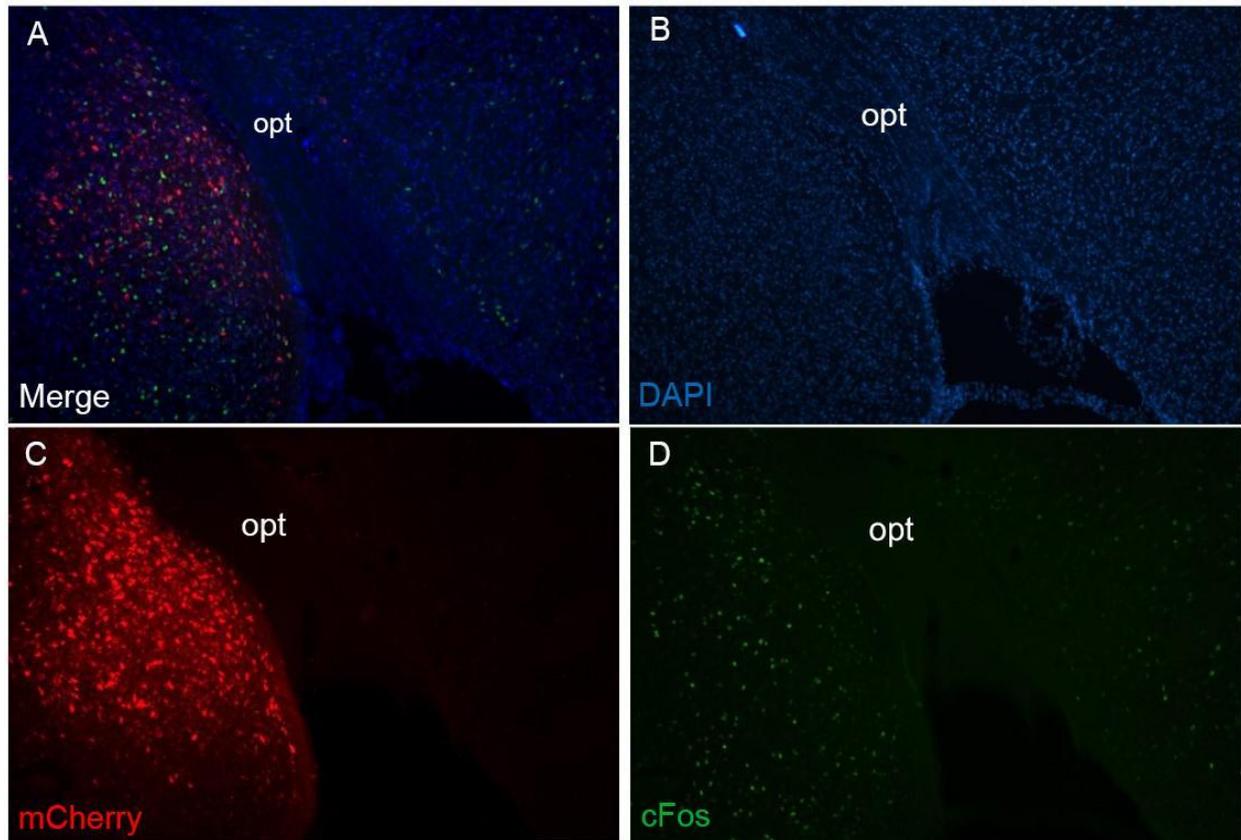
**Figura 14:** Fotomicrografia de corte frontal (40 $\mu$ m) de camundongo macho C57BL/6J (caso A38) que recebeu injeção de vetor viral na região do MeA e de salina i.p anteriormente à exposição à derrota social.



Tripla marcação fluorescente (merge, 14A) para a proteína Fos (14D), para proteína fluorescente mCherry, repórter do vírus (14C) e para o DAPI, para referência citoarquitetônica do MeAd,av (14B).

A figura 15 mostra a injeção na região no MeApd/pv do mesmo animal transfectado com o vírus *AAV5-hSyn-hM4D(Gi)-MCherry*, onde (figura 15C) observamos uma expressão ainda maior do gene repórter, uma quantidade mais significativa de células Fos positivas (Figura 15D) e células com dupla marcação Fos/mCherry (figura 15A).

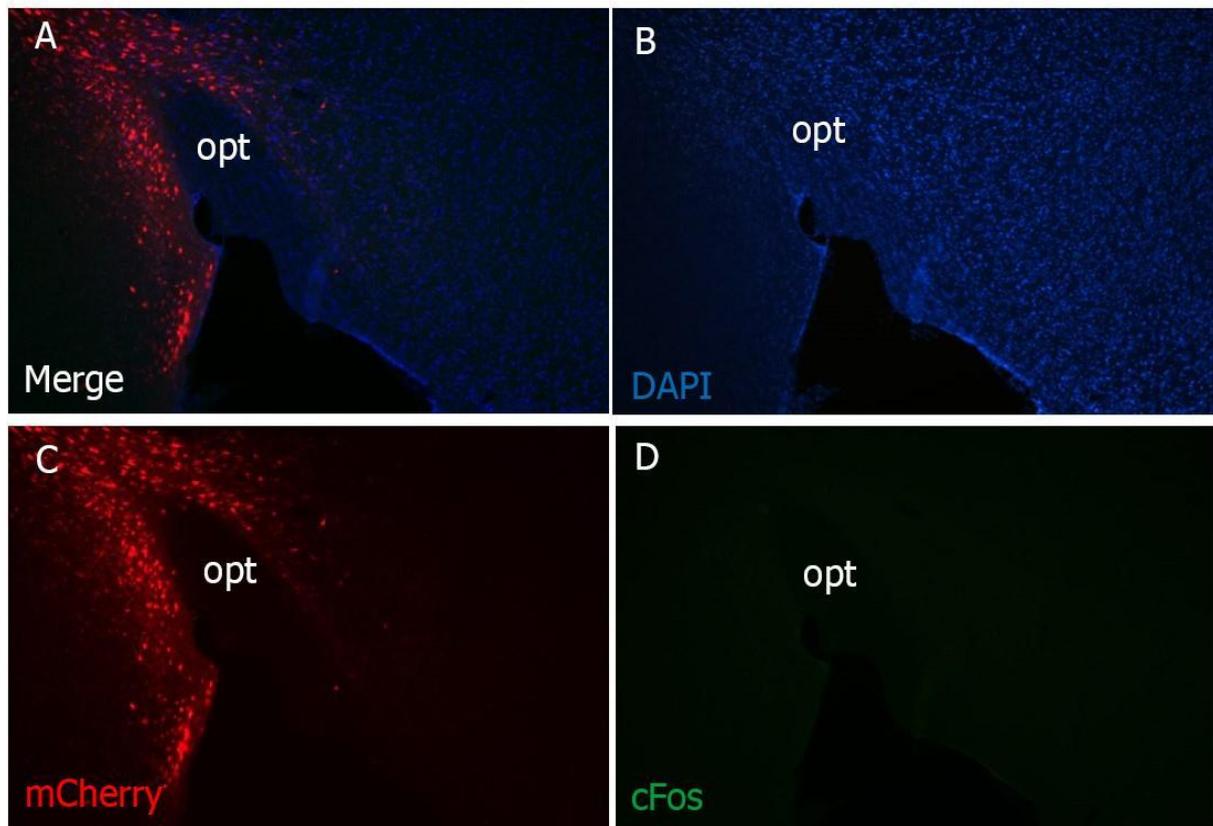
**Figura 15:** Fotomicrografia de corte frontal (40 $\mu$ m) de camundongo macho C57BL/6J (caso A38) que recebeu injeção de vetor viral na região do MeA e de salina i.p anteriormente à exposição à derrota social.



Tripla marcação fluorescente (merge, 15A) para a proteína Fos (15D), para proteína fluorescente mCherry, repórter do vírus (15C) e para o DAPI, para referência citoarquitetônica do MeApd (15B).

O caso seguinte é de um animal infectado com o vírus *AAV5-hSyn-hM4D(Gi)-MCherry* na região do MeA que passou pela inibição quimiogenética por meio da injeção (ip) de CNO. Sendo assim, o núcleo não estava ativado durante o teste comportamental e esse animal não respondeu com uma significativa expressão de células Fos comparado ao caso anterior. A figura 16C, refere-se a região do MeAad/av com células expressando o gene repórter no qual não vemos expressão da proteína Fos após a derrota social (Figura 16D).

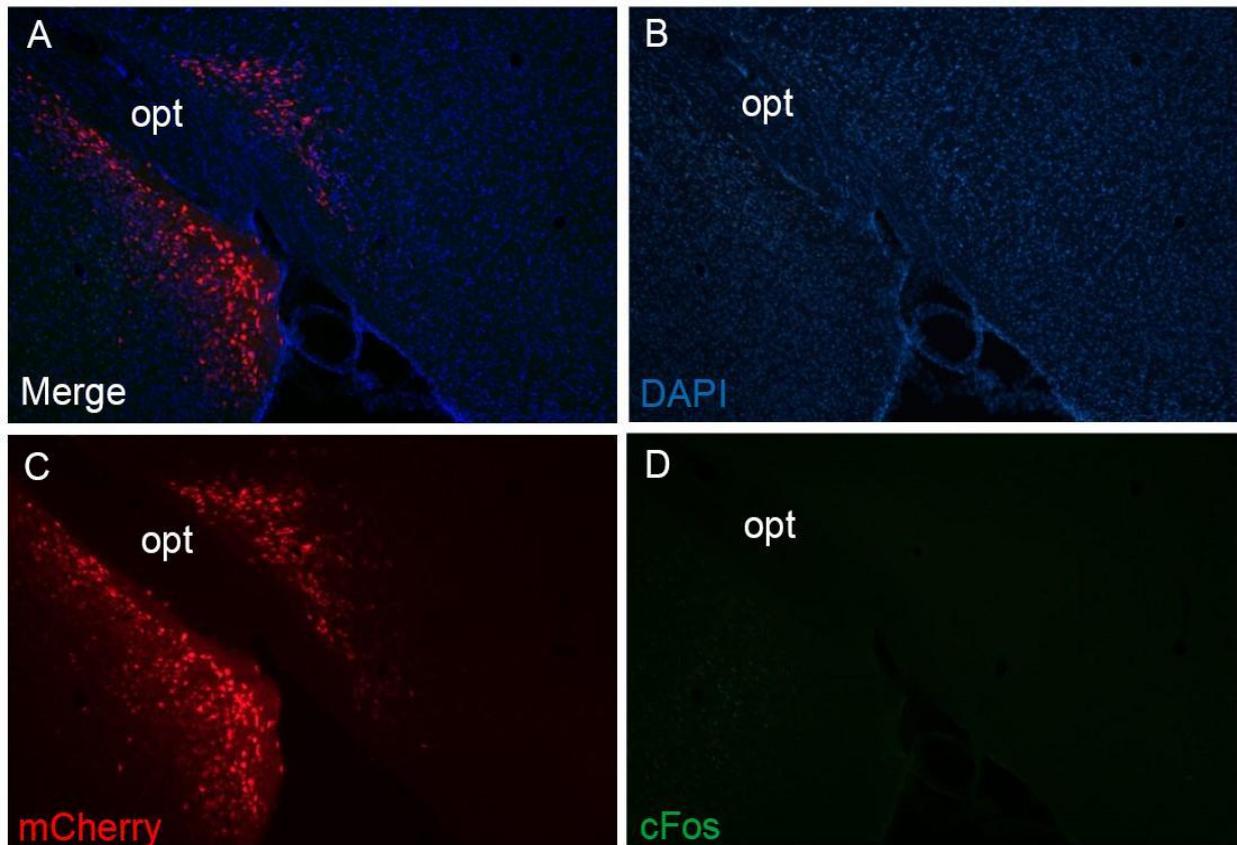
**Figura 16;** Fotomicrografia de corte frontal (40 $\mu$ m) de camundongo macho C57BL/6J (caso A45) que recebeu injeção de vetor viral na região do MeA e de CNO i.p anteriormente à exposição à derrota social.



Tripla Marcação fluorescente (merge, 16A) para a proteína Fos (16D), para proteína fluorescente mCherry, repórter do vírus (16C) e para o DAPI, para referência citoarquitetônica do MeAad/av (16B).

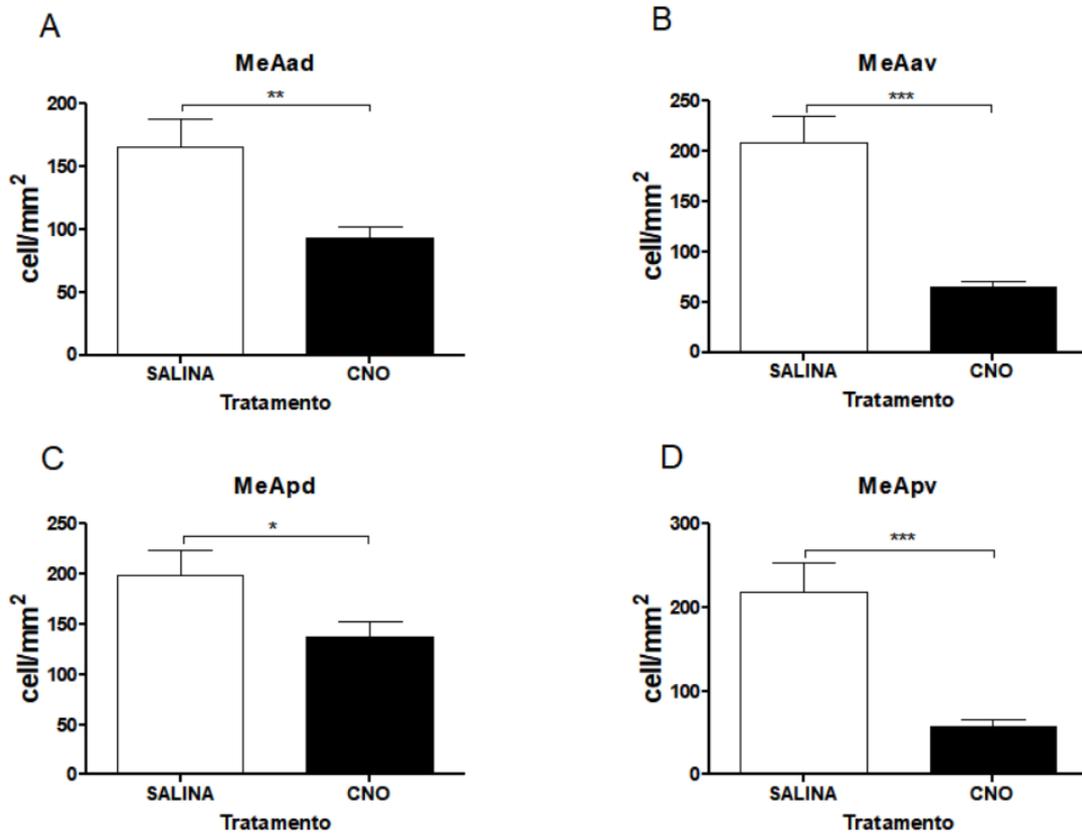
Da mesma forma, vemos que, ao longo da distância rosto-caudal, não houve mudança em relação à expressão de Fos. A figura 17C refere-se às células com o gene repórter na região do MeApd/pv e que não estavam ativadas durante a derrota social, uma vez que há baixa expressão de Fos (Figura 17D) onde identificamos a fluorescência das células infectadas com o vírus.

**Figura 17:** Fotomicrografia de corte frontal (40 $\mu$ m) de camundongo macho C57BL/6J (caso A45) que recebeu injeção de vetor viral na região do MeA e de CNO i.p anteriormente à exposição à derrota social.



Tripla marcação fluorescente (merge, 17A) para a proteína Fos (17D), para proteína fluorescente mCherry, repórter do vírus (17C) e para o DAPI, para referência citoarquitetônica do MeApd/pv (17B).

Após a análise qualitativa das imagens, comparando o local da injeção com a expressão ou não da proteína marcadora da atividade neural, buscamos quantificar a densidade células de Fos positivas de todos os casos dentro do **Grupo CYsalina** e **CYCNO**, a fim de avaliar se houve diferença na densidade de células com expressão de Fos no grupo controle (salina) em relação ao grupo experimental (CNO). O gráfico 11, compara as regiões do MeA entre os grupos salina e CNO, com a análise estatística vimos que houve diferença significativa na densidade de células com expressão de Fos nas subdivisões do medial da amígdala.



**Gráfico 11-** Densidade de células Fos-positivas por milímetros quadrados da região do MeAad (A) houve diferença significativa entre os grupos: *Pvalue* (0,004),  $t=3,442$ ,  $df=14$ ; MeAav (B) houve diferença significativa entre os grupos *Pvalue* (0,0001),  $t=5,987$   $df=14$ ; MeApd (C) houve diferença significativa entre os grupos *Pvalue* (0,0473),  $t=2,175$ ,  $df=14$ ; MeApv (D) houve diferença significativa entre os grupos *Pvalue* (0,0002),  $t=4,996$ ,  $df=14$ . Dados expressos como média $\pm$ EP, ns, ( $p<0,05$ ).

Com base nesses dados, buscamos analisar a porcentagem de ativação e inibição de cada subdivisão do MeA a partir das médias da densidade de células de Fos. A tabela 3 compara as médias entre as densidades dos grupos tratados com injeções i.p de salina e de CNO e mostra a porcentagem de ativação e inibição das regiões durante a exposição à derrota social.

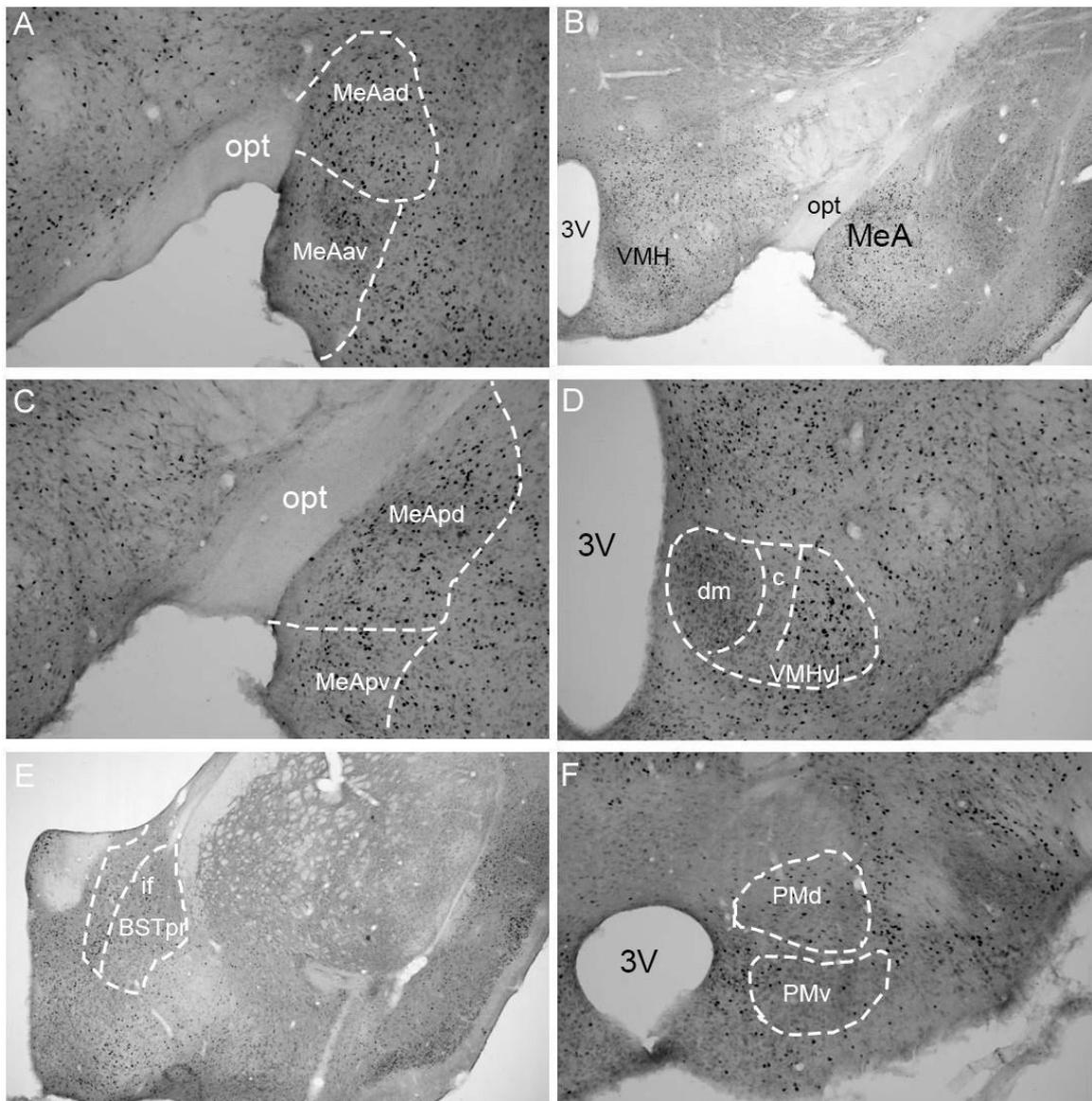
**Tabela 3** – Porcentagem de ativação e inibição das subdivisões do MeA

|                                  | <b>Subdivisões do Medial da Amígdala</b>    |              |              |              |
|----------------------------------|---|--------------|--------------|--------------|
|                                  | <b>MeAad</b>                                | <b>MeAav</b> | <b>MeApd</b> | <b>MeApv</b> |
| <b>Tratamento</b>                | <b>Média da densidade de células de Fos</b> |              |              |              |
| <b>Salina</b>                    | 166,072                                     | 208,746      | 198,354      | 217,706      |
| <b>CNO</b>                       | 93,4011                                     | 64,221       | 137,001      | 57,0722      |
|                                  |   |              |              |              |
| <b>Grupo CYCNO % de ativação</b> | 56,24%                                      | 30,77%       | 69,07%       | 26,22%       |
| <b>Grupo CYCNO % de inibição</b> | 43,76%                                      | 69,23%       | 30,93%       | 73,78%       |

### 3.4 Imuno-histoquímica

Além das análises nas contagens de densidade celular por imunofluorescência dos animais do Grupo **CYCNO** e **CYsalina**, foi selecionado 6 casos, 3 do grupo **CYsalina** e 3 do grupo **CYCNO**, para contagem da densidade celular por imuno-histoquímica dos núcleos alvos do MeA que estiveram ativados durante o comportamento de defesa social. A figura 18 se refere à um animal do grupo **CYsalina**.

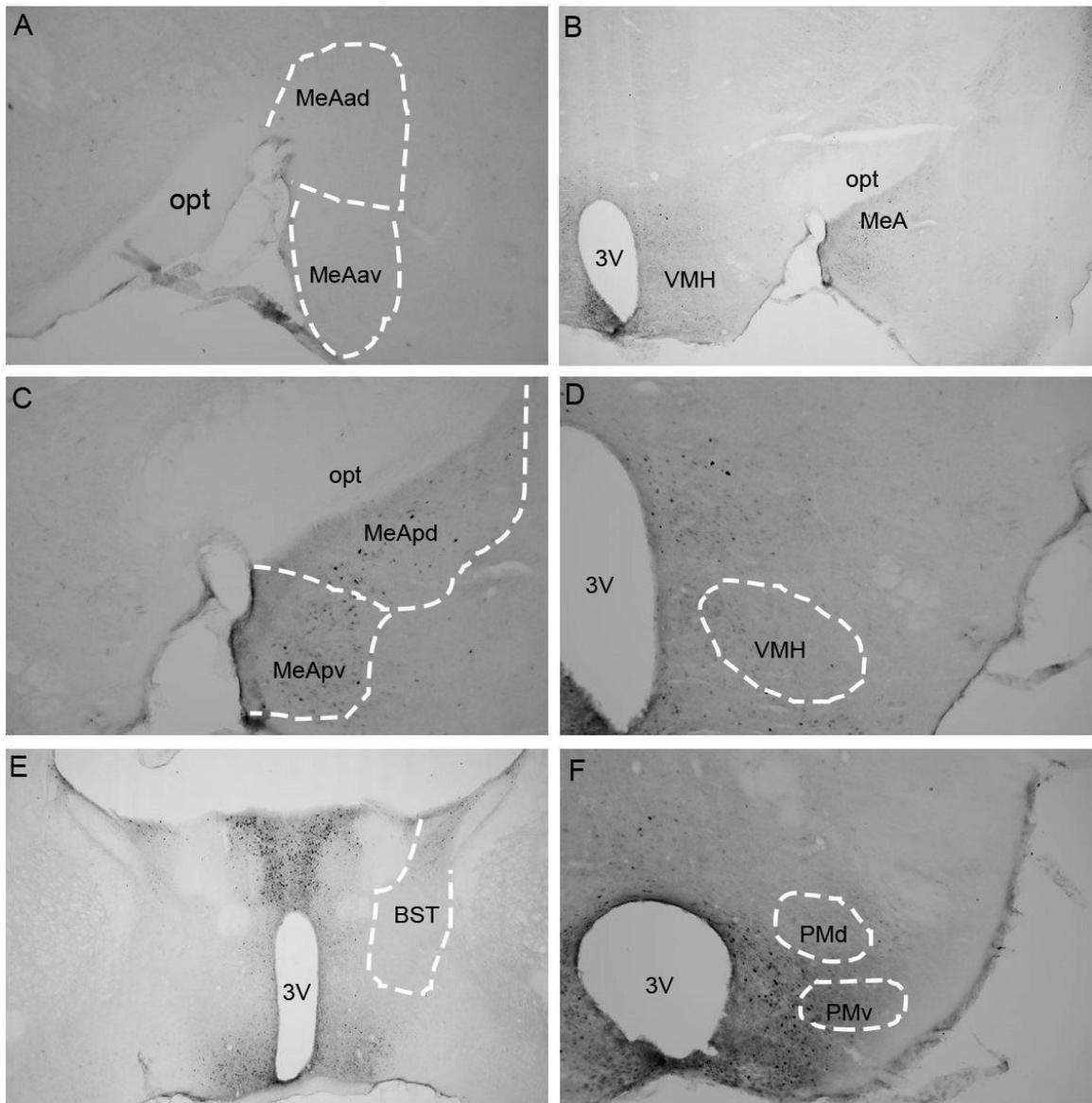
**Figura 18:** Fotomicrografia de corte frontal (40µm) de camundongo macho C57BL/6 (caso A38-macho) transfectado com o vírus AAV5-*hSyn-hM4D(Gi)-MCherry* na região do MeA.



Cortes Imunoreagidos com anticorpo anti-FOS: A- região destaque do MeAad e MeAav, aumento de 10X; B- Aumento de 4X na região do MeApd; C- Região do MeApd e MeApv com aumento de 10X; D- região do VMH, aumento de 10X; E- Região do BST, com aumento de 4X; F- Região dos núcleos PMd e PMv, com aumento de 10X. Abreviaturas: 3V- terceiro ventrículo; BST- núcleo da estria terminal; pr- parte principal; if- parte interfascicular; MeA- núcleo medial da amígdala; MeAad- núcleo medial da amígdala porção anterodorsal; MeAav- núcleo medial da amígdala porção anteroventral; MeApd- núcleo medial da amígdala porção posterodorsal; MeApv- núcleo medial da amígdala porção posteroventral; VMH- núcleo ventromedial do hipotálamo; dm- parte dorsomedial; c- parte central; vl- parte ventrolateral; PMd- núcleo pré mamilar dorsal; PMv- núcleo pré mamilar ventral; opt- trato óptico.

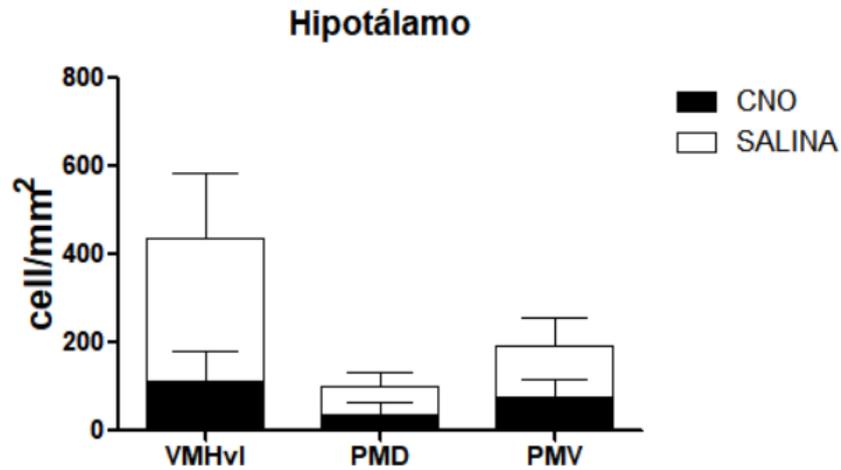
Da mesma forma, realizamos o processamento e contagem celular dos animais que receberam injeções i.p de CNO do grupo CYCNO. A figura 19 corresponde aos mesmos núcleos do caso anterior, a fim de compararmos a ativação durante a exposição à derrota social.

**Figura 19:** Fotomicrografia de corte frontal (40µm) de camundongo macho C57BL/6 (caso A45-macho) transfectado com o vírus AAV5-*hSyn-hM4D(Gi)-MCherry* na região do MeA.

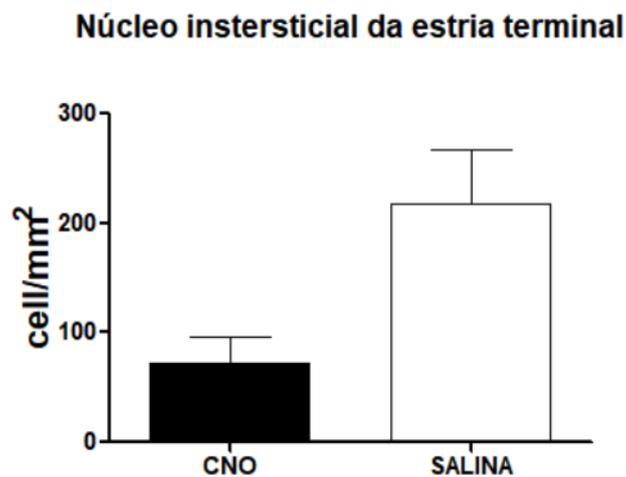


Cortes Imunoreagidos com anticorpo anti-FOS: A- região destaque do MeAad e MeAav, aumento de 10X; B- Aumento de 4X na região do MeApd; C- Região do MeApd e MeApv com aumento de 10X; D- região do VMH, aumento de 10X; E- Região do BST, com aumento de 4X; F- Região dos núcleos PMd e PMv, com aumento de 10X. Abreviaturas: 3V- terceiro ventrículo; BST- núcleo da estria terminal; pr- parte principal; if- parte interfascicular; MeA- núcleo medial da amígdala; MeAad- núcleo medial da amígdala porção anterodorsal; MeAav- núcleo medial da amígdala porção anteroventral; MeApd- núcleo medial da amígdala porção posterodorsal; MeApv- núcleo medial da amígdala porção posteroventral; VMH- núcleo ventromedial do hipotálamo; dm- parte dorsomedial; c- parte central; vl- parte ventrolateral; PMd- núcleo pré mamilar dorsal; PMv- núcleo pré mamilar ventral; opt- trato óptico.

Com isso, buscamos quantificar a densidade celular desses mesmos casos selecionados, para avaliar a densidade de células Fos positivas nos núcleos hipotalâmicos e na região da estria terminal, de ambos os grupos. O gráfico 12, compara a região do VMHvl, PMd, PMv e o gráfico 13 se refere a contagem obtida no BST, dos grupos salina e CNO, e mesmo com uma aparente diminuição da densidade nesses núcleos, não houve diferença significativa após a análise estatística.



**Gráfico 12-** Densidade de células Fos-positivas por milímetros quadrados da região do VMHvl, PMd e PMv dos animais do grupo experimental e controle. Dados expressos como média±EP, *Pvalue* (0,3292),  $t=1,110$ ,  $df=4$ ; ns, ( $p<0,05$ ).



**Gráfico 13-** Densidade de células Fos-positivas por milímetros quadrados da região do BST nos animais do grupo experimental e controle. Dados expressos como média±EP, *Pvalue* (0,3853)  $t= 2,686$   $df= 4$  ns, ( $p<0,05$ ).

## 4. DISCUSSÃO

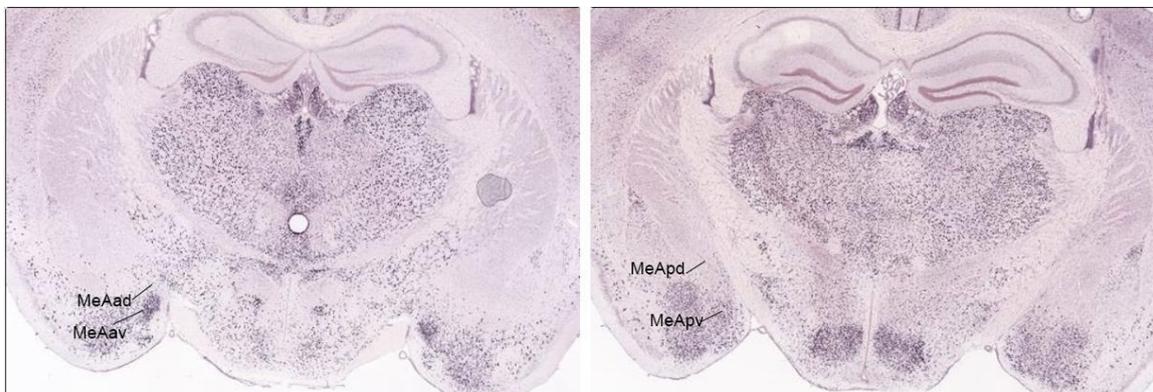
O presente trabalho visa entender o papel do MeA na detecção de pistas durante a defesa social, bem como quais estruturas se relacionam com este núcleo com projeções eferentes glutamatérgicas.

### 4.1 Estudo de mapeamento das projeções glutamatérgicas eferentes do MeA

Investigamos as projeções eferentes do MeA em animais machos e fêmeas *Vglut2-ires-Cre*, utilizando um vírus traçador anterógrado com a fluorescência da proteína GFP. Essa técnica de rastreamento possui alta sensibilidade de detecção e no nosso caso estava restrita a marcar neurônios glutamatérgicos, por meio da dependência da enzima cre. Com isso, visualizamos as eferências pelo método imunohistoquímico e observamos como cada subdivisão do MeA se projeta para as regiões dos núcleos hipotalâmicos. O trabalho de Canteras (1995), descreve projeções eferentes das subdivisões do MeA em ratos.

Como podemos ver na figura 19, em camundongos, o MeA possui neurônios glutamatérgicos em todas as suas subdivisões, exceto no MeApd. Os estudos de Sepideh e colaboradores (2014) identificaram neurônios de projeções GABAérgicas no MeApd e ausência desse neurotransmissor no MeApv. Em nosso trabalho, observamos que a região posterodorsal de fato não possui neurônios glutamatérgicos.

**Figura 20:** Corte coronal da região do MeA de um camundongo C57BL/6. Marcação de neurônios *Vglut2-Cre*.



**Fonte:** Allen Brain Atlas - Mouse Brain Atlas, Data portal, Disponível em: <<https://mouse.brain-map.org/>>.

Em nosso trabalho, vimos que o MeAad possui densas projeções glutamatérgicas para o VMH e para o PMv. Observamos projeções com densidade moderada para o BSTif/tr e poucas projeções glutamatérgicas para o BSTpr. Esses resultados estão parcialmente de acordo com a descrição de Canteras et al. (1995) que afirma que o MeAad eferenta diversas regiões hipotalâmicas,

principalmente na zona medial, como o PMV, mas em seu trabalho, Canteras et al. (1995) mostra projeções apenas para a região da cápsula do VMH e essas projeções não adentram o VMH. Esta disparidade pode ser explicada por uma contaminação do MeAav ou diferenças entre ratos e camundongos. Mais experimentos são necessários para a confirmação de nossos dados. Quanto às projeções glutamatérgicas do MeAad para o BSTif/tr e BSTpr, nossos dados estão de acordo com o resultado apresentado por Canteras et al. (1995).

O trabalho de Canteras et al. (1995) não apresenta todas as projeções eferentes do MeAav, mas evidencia densas projeções do MeAav para o VMH como um todo. Também encontramos densas projeções glutamatérgicas do MeAav para todo o VMH e não encontramos projeções glutamatérgicas do MeAav para o PMV. Como encontrado em nossos casos para o MeAad, o MeAav também se projeta moderadamente para o BSTif/tr e pouco para o BSTpr.

Quanto às projeções glutamatérgicas eferentes do MeApv, observamos mais uma vez densas projeções para o VMH e muito poucas para o PMV, já para o BST encontramos densidade moderada de projeções glutamatérgicas tanto para o BSTpr quanto para o BSTif/tr. Canteras et al. (1995) observaram projeções para o VMH e BSTpr provenientes do MeApv e não descreveram projeções dessa subdivisão do MeA para o PMV e BSTif/tr. Neste caso apenas as projeções encontradas para BSTif/tr estão em desacordo, mas não podemos atribuir essa diferença à contaminação do MeApd de nossa injeção, uma vez que o MeApd não apresenta neurônios glutamatérgicos.

Canteras (1995), descreveu o MeA em duas grandes divisões ventral e dorsal, onde a divisão dorsal é constituída pelo MeApd e a ventral inclui o MeAad, MeAav e o MeApv. A divisão ventral possui projeções principalmente para o hipotálamo, para os núcleos da zona medial relacionados à modulação de comportamentos reprodutivos e defensivos. Em nosso trabalho, apresentamos as eferências glutamatérgicas da parte ventral do MeA. Apesar dessas descrições, seria necessário estudos com injeções mais precisas e restritas nas subdivisões do MeA, evitando contaminações de áreas subjacentes, para o esclarecimento dos alvos glutamatérgicos do MeA.

#### **4.2 Estudo com inibição farmacogenética na região do MeA envolvidos no comportamento de defesa social**

A literatura mostra um papel importante do núcleo medial da Amígdala na organização de comportamentos sociais e que lesões nessa área afetariam a sobrevivência do animal (Vochtelo e Koolhass, 1987). O estudo de inibição por meio de DREADDs possibilita a inativação temporária

desse núcleo a fim de entendermos as respostas comportamentais de um animal exposto à um dominante sem a sua principal via de recebimento das pistas olfatórias. De fato, os neurônios do órgão vomeronasal de mamíferos, o VNO, se projetam para o AOB que por sua vez envia projeções para o núcleo intersticial do trato olfatório acessório, para o núcleo intersticial da estria terminal (BST), bem como para os núcleos da amígdala medial (Dulac e Torello, 2003). Essas informações são levadas para regiões de núcleos hipotalâmicos, como o VMH (Wang et al., 2015), que fazem parte da organização do circuito de defesa. Porém pouco se sabe sobre como as manipulações do MeA levam a alterações comportamentais durante a derrota social.

Em nossos experimentos a manipulação viral do grupo CYCNO e CYsalina foi satisfatória e não alterou a mobilidade ou o desempenho desses indivíduos. Apesar de trabalharmos com uma carga viral alta e perceber que esse volume englobou todo o MeA, os resultados de densidade das células de Fos revelaram uma prevalência de inibição na região ventral do núcleo, ou seja, embora houvesse marcação fluorescente do vetor viral nas quatro subdivisões do MeA isso não significa necessariamente que houve uma inibição total desse núcleo. Esses dados serão discutidos mais à frente.

O teste de Campo Aberto foi aplicado com o objetivo de avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório do animal, a fim de analisar se a manipulação viral causou alterações na capacidade motora desses animais. O teste mediu a distância percorrida em cm<sup>2</sup> e não mostrou diferença entre as médias dos grupos. Assim como o tempo percorrido em segundos no centro e na periferia do aparato, não teve diferença quando comparamos os animais que receberam injeções de CNO aos animais que receberam salina, ou seja, tais procedimentos não alteraram o desempenho desses indivíduos.

Com isso, demos continuidade ao teste de territorialidade, onde cada dado foi analisado com base no etograma desenvolvido a partir da descrição feita por Blanchard e colaboradores (1979). Os resultados não mostraram diferença significativa para o comportamento de defesa passiva dos animais que tiveram inibição do MeA em relação aos animais controles. Desse modo, sabendo que houve uma inibição parcial desse núcleo e que a manipulação teve efeito no comportamento de defesa ativa, tais resultados nos levam a questionar de que forma as informações feromonais do co-específico são recebidas para acarretar em comportamentos de defesa passiva como o *freezing*, em animais com a inibição. De acordo com Canteras e colaboradores (2001), a região basomedial e lateral da amígdala respondem de forma majoritária aos estímulos de um predador ou co-específico, ao passo que o MeA estaria recebendo somente o olfatório. Dessa forma, essas regiões estão provavelmente integrando

outras pistas sensoriais derivadas do co-específico que não as olfativas, gerando comportamentos de defesa frente a uma ameaça (Martinez et al., 2008).

Analisamos pelo método de imunofluorescência a atividade neuronal do MeA através da expressão da proteína Fos nos animais que passaram pela exposição ao paradigma. Os resultados mostraram pouca expressão da proteína no grupo CYCNO que receberam injeções de CNO, ocasionando em uma inibição parcial em cada subdivisão do MeA. As imagens exibem as regiões do MeAad, av, pd e pv de dois casos que foram escolhidos considerando a resposta comportamental e a qualidade da infecção viral. Ao compararmos qualitativamente esses dois casos é visível perceber, pela fluorescência, a ausência de Fos nos animais que sofreram a inibição e tiveram uma infecção satisfatória do vírus e conseqüentemente não tiveram dupla marcação Fos/mCherry. A partir disso, buscamos quantificar e analisar estatisticamente essa diferença entre todos os casos do grupo controle e experimental.

Nossas análises mostraram uma diferença significativa nas quatro subdivisões do MeA, sendo a região ventral do núcleo a que sofreu maior inibição gerando um *Pvalue* menor em comparação a região dorsal do núcleo. Nossos resultados estão de acordo com os estudos de Canteras (2002) e McGregor e colaboradores (2004), uma vez que, a porcentagem de inibição na região ventral da amígdala (MeAav - 69,23% e MeApv - 73,78%), foi maior em relação a região dorsal, revelando que a inibição quimiogênica foi maior em áreas com o maior número de neurônios glutamatérgicos, tais áreas se projetam para o VMH, núcleo que está ativado durante a derrota social. Portanto, é possível que as informações integradas pelo VMH que geram respostas de defesa ativa na situação de derrota social sejam provenientes de neurotransmissores glutamatérgicos do MeApv e MeAav, pois a inibição desse circuito levou a alteração no comportamento de defesa desses animais. Wang e colaboradores (2019) mostraram elevada ativação de células do núcleo VMHvl após a exposição à derrota social em camundongos e que a inibição desse núcleo compromete a desempenho de defesa durante um encontro agonístico, alterando comportamentos de escape ou ataque na presença do co-específico dominante.

Vochtelo e Koolhass (1997) trabalharam com lesões bilaterais no medial da amígdala em ratos e concluíram que tal procedimento reduziu comportamentos defensivos, mas que essa redução só atingiu significância nos animais experientes que já haviam passado pela exposição ao opositor, a reexposição diminuiu a frequência de derrotas. Nossos resultados de defesa total e de defesa passiva dos animais com inibição do MeA, não foram diferentes dos animais controles, como já mencionado. Porém houve uma diminuição significativa no comportamento de defesa ativa que constitui em um

conjunto de comportamentos como resposta a um ataque mais direto do co-específico. Isso inclui os movimentos de *upright* ou *boxing*, e até mesmo movimentos de ação defensiva vertical que permite rastrear de onde está vindo o ataque na intenção de sempre proteger a região do dorso do defensor (Blanchard e Blanchard, 1989). Nosso grupo experimental apresentou uma diminuição na defesa ativa, ou seja, o intruso parecia reagir menos aos ataques do residente. Buscamos ainda entender qual componente da defesa ativa foi mais importante para essa alteração e vimos que houve uma diminuição no tempo em que os animais do grupo CYCNO permaneciam em *upright*. O trabalho de Blanchard e colaboradores (2015) distinguem as respostas defensivas e em quatro principais fatores, um deles está relacionado a resposta de ameaças/ataque como o *upright*, que reflete em reações de defesa mais efetivas e rápidas de serem evocadas. Os nossos animais do grupo CYCNO responderam menos a essas ameaças em relação ao grupo controle.

Essa diminuição no comportamento de defesa ativa poderia ter acontecido devido a diminuição dos ataques do animal residente, uma vez que um intruso que sofre menos ataques precisa de defender menos (Blanchard, 1997). Entretanto, mostramos que não houve diferença no comportamento agressivo dos animais residentes em ambos os grupos indicando que a redução da defesa ativa observada em nosso grupo experimental aconteceu em decorrência da inibição do MeA. Da mesma forma, o comportamento de territorialidade inata dos residentes não foi alterado em resposta à diminuição da defesa ativa dos animais do grupo CYCNO.

Durante um encontro agonístico, ocorre a percepção nasal e a entrada de feromônios, que são bombeados para o VNO que integra essas informações e envia ao AOB que por sua vez se projeta para o MeA e para o BST (Spehr et al., 2006). Essas informações, então, chegam ao VMHvl e ao PMv e irão organizar os comportamentos sociais (Canteras, 2015). Desta maneira, após a análise da ativação do MeA, decidimos investigar os núcleos que estão recebendo eferências do MeA e que estão ativados durante os comportamento de defesa social. Escolhemos 3 casos do grupo CYsalina e 3 casos do grupo CYCNO para quantificarmos as células Fos positivas nas regiões mencionadas pelo método imunohistoquímico. Apesar de não haver diferença significativa entre grupos controle e experimental, provavelmente pelo número reduzido de animais que analisamos, parece haver uma diminuição na densidade de células ativadas nos núcleos VMHvl e BSTpr nos animais que tiveram a inibição do MeA. Wang e colaboradores (2019) analisaram a atividade do núcleo VMHvl quando um animal é exposto a uma ameaça social e mostraram que para gerar os comportamentos de defesa social esse núcleo é criticamente importante. Outros trabalhos serão necessários para esclarecer o papel dos alvos do MeA na organização da derrota social.

## 5. CONCLUSÃO

Esse trabalho buscou identificar as projeções glutamatérgicas do núcleo medial da amígdala, bem como observar a importância deste núcleo para os comportamentos de defesa social. Constatamos que o MeA envia projeções glutamatérgicas para núcleos hipotalâmicos, o VMH e o PMV, e para regiões do BST como BSTpr e BSTif/tr, estruturas ativadas durante a exposição social ao co-específico dominante. A inibição farmacológica do MeA, particularmente de suas subdivisões ventrais, levou a diminuição da defesa ativa nesses animais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, D. J., Dyson, E. M., Walsh, M. L., Petrovic, D. M., Cohabitation with a female activates testosterone-dependent social aggression in male rats independently of changes in serum testosterone concentration. **Physiology and Behavior**. 39, 693-698, 1988.
- Alheid G. F., Heimer L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. **Neuroscience**. 27: 1-39, 1988.
- Ambruster, B. N., Li, X., Pausch, M. H., Herlitze, S., Roth, B. L., Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand. **PNAS**, 104 (12): 5163-5166, 2007.
- Alexander, D. H., Novembre, J., Lange, K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. **Genome Research**. 19: 1655-1664, 2009.
- Blanchard, RJ; Blanchard, DC. Aggressive behavior in the rat. **Behav. Biol.**; 21: 197-224, 1977.
- Blanchard, RJ; Blanchard, DC; Takahashi, T; Kelley, M. Attack and defensive behaviours in the albino rat. **Animal Behavior**; 25: 622-634, 1977.
- Belluscio, L., Koentges, G., Axel, R., Dulac, C., A map of Pheromone Receptor Activation in the Mammalian Brain. **CellPress**. 97(2), 209-220, 1999.
- Bolles, RC. Species-specific defense reactions and avoidance learning. **Psychol Rev.**; 77(1): 32- 48, 1970.
- Brennan, PA; Kendrick, KM. Mammalian social odours: attraction and individual recognition. **Phil. Trans. R. Soc. B.**; 361: 2061-2078, 2006.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. **J. Comp. Neurol.**; 360:213-45. Sep 18;360(2):213-45. Erratum in: *J Comp Neurol* 1996 May 27;369(2):328-30, 1995.
- Canteras, N.S., Chiavegatto, S., Ribeiro do Valle, L.E., Swanson, L.W., Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. **Brain Research Bulletin**, 44(3): 297-305, 1997.
- Canteras, N.S., Ribeiro-Barbosa, E.R., Comoli, E., Tracing from the dorsal preammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, São Paulo Brasil, 25(7-8): 661-668, 2001.
- Canteras, NS. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. **Pharmacol. Biochem. Behav.**; 71(3): 481-491, 2002.
- 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. Neuroscience.**; 77: 220-300, 2015.

Chamero, P; Marton, TF; Logan, DW; Flanagan, K; Cruz, JR; Saghatelian, A; Cravatt, BF; Stowers, L. Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. **Nature.**; 450(7171):899-902, 2007.

Comoli E, Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS. Afferent connections of the dorsal premammillary nucleus. **J Comp Neurol.** Jul 17;423(1):83-98, 2000.

Defensor EB, Corley MJ, Blanchard RJ, Blanchard DC. Facial expressions of mice in aggressive and fearful contexts. **Physiol Behav,** 107(5):680-5, 2012.

Dong HW, Swanson LW. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. **J Comp Neurol.** Apr 12;471(4):396-433. Erratum in: *J Comp Neurol.* 2004 Jul 5;474(4):603-4, 2004.

Dulac, C; Kimchi, T. Neural Mechanisms Underlying Sex-specific Behaviors in Vertebrates. **Curr. Opin. Neurobiol.**; 17(6): 675–683, 2007.

Dulac, C; Torello, AT. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. **Nat. Rev. Neurosci.**; 4(7):551-62, 2003.

Eilam, D. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. **Behavioral Brain Research,** v. 1-2, n. 142, 2003.

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

Ferguson, S.M., Neumaier, J.F., Using DREADDs to investigate addiction behaviors. **Current Opinion in Behavioral Sciences,** WA United States, 2: 69-72, 2015.

Friard, O; and Gamba, M. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. **Methods Ecol Evol,** 7, 2016.

Gilbert, P; Allan, S. The role of defeat and entrapment (arrested flight) in depression: An exploration of an evolutionary view. **Psychological Medicine.**; 28, 585–598, 1998.

Gilbert, P; Allan, S; Brough, S; Melley, S; Miles, JNV. Relationship of anhedonia and anxiety to social rank, defeat, and entrapment. **Journal of Affective Disorders,** 71, 141–151, 2002.

Gu, G; Cornea, A; Simerly, RB. Sexual differentiation of projections from the principal nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis. **J Comp Neurol.** Jun 9;460(4):542-62, 2003.

Hahn, JD; Swanson, LW. Connections of the lateral hypothalamic area juxtadorsomedial region in the male rat, **J. Comp. Neurol.** 520(2),1831–1890, 2012.

Haohong, L., Penzo M.A., Taniguchi, H., Kopec, C.D., Huang, Z.J., Li, B. Experience-dependent modification of a central amygdala fear circuit. **Nat Neurosci,** Cold Spring Harbor, NY, United States, 16(3): 332-339, 2013.

- Hsu, S.; Raine, L.; Fanger, H. The Use of Antiavidin Antibody and Avidin-Biotin-Peroxidase Complex in Immunoperoxidase Technics, **American Journal of Clinical Pathology**, 75(6): 816–821, 1981.
- 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.** 175(2):341-346, 1979.
- Kazemiha, VM. Real-time PCR assay is superior to other methods for the detection of mycoplasma contamination in the cell lines of the **National Cell Bank of Iran**. 68(4): 3-7, 2015.
- Kollack-Walker, S; Newman, SW. Mating and agonistic behavior produce different patterns of fos immunolabeling in the male Syrian hamster brain. **Neuroscience**. 66(3): 721-736, 1995.
- Land, BB; Narayanan, NS; Liu, RJ; Gianessi, CA; Brayton, CE; Grimaldi, DM; Sarhan, M; Guarneri, DJ; Deisseroth, K; Aghajanian, GK; DiLeone, RJ. Medial prefrontal D1 dopamine neurons control food intake. **Nat Neurosci**. 17(2):248-53, 2014.
- Lin, D; Boyle, MP; Dollar, P; Lee, H; Lein, ES; Perona, P; Anderson, DJ. Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. **Nature**. 470(7333):221-6, 2011.
- Marín-Blasco, I.; Muñoz-Abellán, C.; Andero, R. Neuronal Activation After Prolonged Immobilization: Do the Same or Different Neurons Respond to a Novel Stressor? **Cerebral Cortex**, 2017.
- Markham, CM; Norvelle, A; Huhman, KL. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the acquisition and expression of conditioned defeat in Syrian hamsters. **Behav Brain Res**. 198(1):69-73, 2009.
- Martinez, R.C., Carvalho-Netto, E.F., Amaral, V.C.S., Nunes-de-Souza, R.L., Canteras, N.S., Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. **Behavioural Brain Research**, 192(2); 185-190, 2008.
- McGregor IS, Hargreaves GA, Apfelbach R, Hunt GE. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. **J Neurosci** 24:4134–44, 2004.
- Meerlo, P., Ralph E.M., Barry, L.J., Craig, H.H., Dennis, M., New neurons in the adult brain: the role of sleep and consequences of sleep loss. **Sleep Medicine Reviews**, 13(3); 187-194, 2009.
- Miczek, KA. A new test for aggression in rats without aversive stimulation: differential effects of d- amphetamine and cocaine. **Psychopharmacol.** 60: 253-259, 1979.
- Motta, SC; Canteras, NS. Restraint stress and social defeat: What they have in common. **Physiol Behav**. 146:105-110, 2015.

Motta, SC; Goto, M; Gouveia, FV; Baldo, MV; Canteras, NS; Swanson, LW. Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 106(12):4870-4875, 2009.

Motta, SC; Guimaraes, CC; Furigo, IC; Sukikara, MH; Baldo, MV; Lonstein, JS; Canteras, NS. Ventral preammillary nucleus revealing neural circuit for maternal aggression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 110(35):14438-14443, 2013.

Newman, SW. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. **Ann N Y Acad Sci**. 877:242-57, 1999.

Numan, M; Rosenblatt, JS; Komisaruk, BR. Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 91(1):146-64, 1977.

Pfaff, DW; Sakuma, Y. Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. **J. Physiol.** 288:203–210, 1979.

Price, J; Sloman, L; Gardner, R Jr; Gilbert, P; Rohde, P. The social competition hypothesis of depression. **British Journal of Psychiatry**. 164, 309–315, 1994.

Roth, B.L., DREADDs for Neuroscientists. **Neuron**, Califórnia, Estados Unidos, 89(4): 683-694, 2016.

Scott, JP. Agonistic behavior of mice and rats: a review. **Am Zool.**6(4):683-701, 1966.

Scott, JP. An experimental test of the theory that social behavior determines social organization. **Science**.99(2559):42-3, 1944.

Sepideh, K., Robert, K.P.S., Damian, J.I., Pankaj, S., Functional Properties and Projections of Neurons in the Medial Amygdala. **J. Neuroscience**, St. Luzia Austrália, 34(26): 8699-8715, 2014.

Sgoifo, A., Carnevali, L., Alfonso, M.P., Amore, M., Autonomic dysfunction and heart rate variability in depression. **The International Journal on the Biology of Stress**, Parma Itália, 18(3): 343-352, 2015.

Simerly, RB; Chang, C; Muramatsu, M; Swanson, LW. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in-situ hybridization study. **J Comp Neurol**. 294(1):76-95, 1990.

Stewart, S; Jeewajee, A; Wills, TJ; Burgess, N; Lever, C. Boundary coding in the rat subiculum, *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **B Biol. Sci.** 369, 2013.

Swanson, LW. Cerebral hemisphere regulation of motivated behaviour. **Brain Res.** 886(1-2): 113-164, 2000.

Swanson, LW; Petrovich, GD. What is the amygdala? **Trends Neurosci.** 21(8):323-331, 1998.

Taylor, PJ; Gooding, P; Wood, AM; Tarrrier, N. The role of defeat and entrapment in depression, anxiety, and suicide. **Psychol Bull.**137(3):391-420, 2011.

Usunoff, K.G., Schmitt, O., Itzev, D.E., Haas, S.J.-P., Lazarov, N.E., Rolfs, A., Wree, A., Efferent Projections of the Anterior and Posterodorsal Regions of the Medial Nucleus of the Amygdala in the Mouse. **Cells Tissues Organs**, Sofia Bulgaria, 190(5):256-285, 2009.

Veening, JG; Coolen, LM. Neural activation following sexual behavior in the male and female rat brain. *Behav. Brain Res.* 92(2):181-93, 1998.

Vochtelloo, J.D., Koolhaas, J.M., Medial amygdala lesions in male rats reduce aggressive behavior: interference with experience. **Physiology and Behavior**, Haven, The Netherlands, 41(2): 99-102, 1987.