

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^ª Dr^ª Simone Cristina Motta

Versão original

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: Profª Drª 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: Profª Drª Caroline Demarchi Munhoz
Instituição: Universidade de São Paulo (USP) – Instituto de Ciências Biomédicas Pós-Graduação em Farmacologia

Examinador(a): Assinatura:

Nome: Profª Drª Patrícia Pereira Coltri
Instituição: Universidade de São Paulo (USP) – Instituto de Ciências Biomédicas Pós-Graduação em Biologia de Sistemas

Presidente: Assinatura:

Nome: Profª Drª Simone Cristina Motta
Instituição: Universidade de São Paulo (USP) – Instituto de Ciências Biomédicas Pós-Graduação em Biologia de Sistemas



Cidade Universitária "Amendo 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@icb.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.

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

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 Tokeshi (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. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria 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 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 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 Tokeshi (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>	C57bl/6	Macho/male	60 dias/days	550
	Swiss	Macho/male	60 dias/days	80
	Swiss	Fêmea/female	60 dias/days	80

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^a Dr^a 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^o Dr^o 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^o 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 do 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 VMHc/dm/vl, PMv e para o 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 VMHc/dm/vl, PMv and 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.

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 do animal pelo órgão vomeronasal (VNO) (Dulac e Torello, 2003). A cavidade nasal dos roedores contém dois conjuntos de neurônios quimiosensoriais 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 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, ele 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).

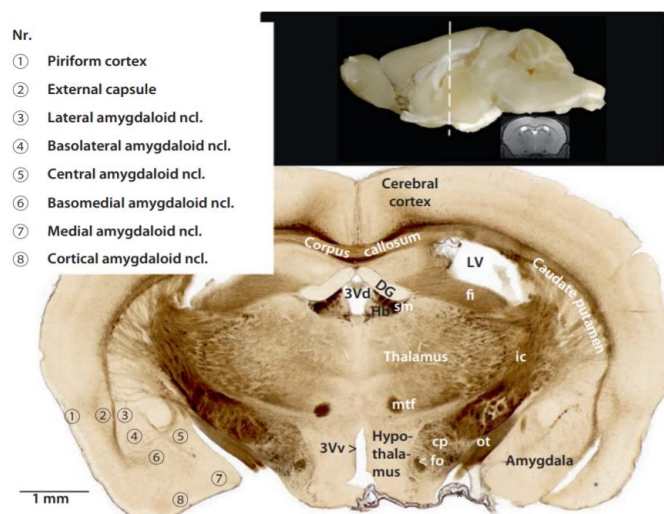
1.4 Núcleo Medial da Amígdala (MeA)

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 cérebro 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 também possui subnúcleos anteriores, o anterodorsal (MeAad) e o anteroventral (MeAav) (Swanson e Petrovich, 1998).

Figura 1: Corte coronal feito em vibrátomo no cérebro de camundongos (C57BL/6) no nível do núcleo habenular (Hb). DG- giro dentado; Cp- pedúnculo cerebral; fi- fímbria hipocámpal; 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.

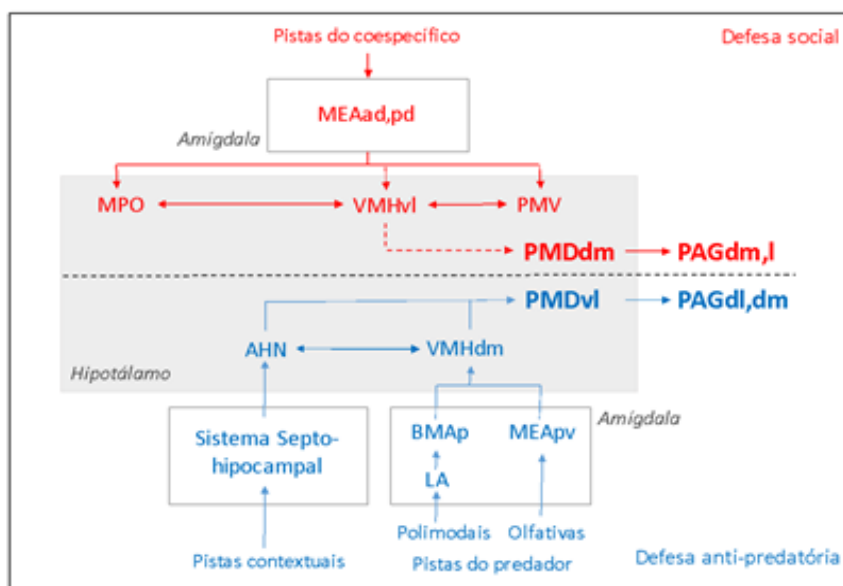
Cádiz-Moretti e colaboradores (2014) também analisaram as projeções eferentes das subdivisões do MeA usando injeções restritas de *fluorogold* em camundongas fêmeas e os resultados mostraram que o MeApd e MeApv recebem projeções robustas para diversos núcleos, como: o AOB, o córtex piriforme, a parte 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-hipocampais 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-optica 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)

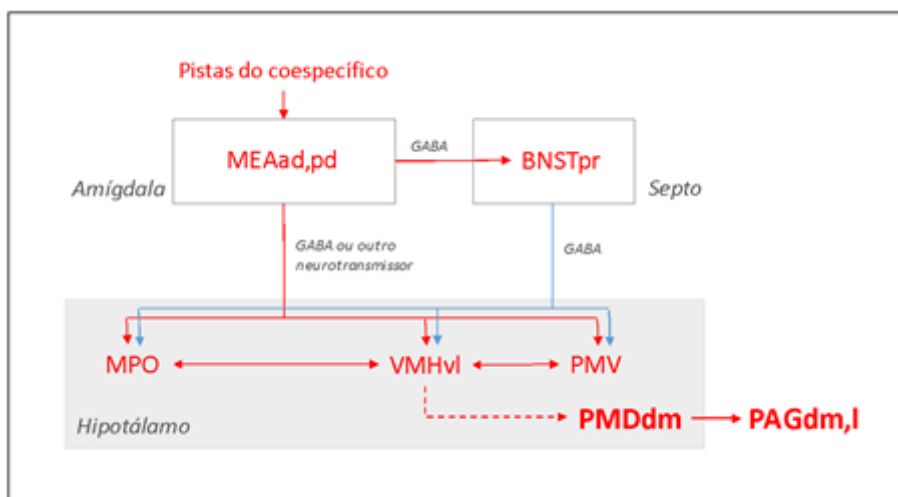
Como é possível notar na figura 2, o comportamento de defesa social não mobiliza o circuito de defesa hipotalâmico, mas o, sexualmente dimórfico; já implicado na organização de diversos comportamentos sociais (Numan e col., 1977; Pfaff e Sakuma, 1979a,b; Kollack-Walker e Newman, 1995; Veening e Coolen, 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 MeApd 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 e 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 ou farmacogenética é uma 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 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 hipoglossos, 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.

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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

Bolles, RC. Species-specific defense reactions and avoidance learning. **Psychol Rev.**; 77(1): 32- 48, 1970.

Brennan, PA; Kendrich, 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 premammillary 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 Techniques, **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; Guarnieri, 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.

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; Tarrier, 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.