

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA E FARMACOLOGIA**

Vinícius Elias de Moura Oliveira

**MODULAÇÃO COLINÉRGICA DE  
COMPORTAMENTOS SOCIAIS EM  
CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte

2015

**Vinícius Elias de Moura Oliveira**

**MODULAÇÃO COLINÉRGICA DE  
COMPORTAMENTOS SOCIAIS EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e  
Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Grace Schenatto Pereira Moraes**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maristela de Oliveira Poletini**

Belo Horizonte

2015

043

Oliveira, Vinícius Elias de Moura.

Modulação colinérgica de comportamentos sociais em camundongos  
[manuscrito] / Vinícius Elias de Moura Oliveira. - 2015.

121 f.; il.; 29 cm.

Orientadora: Grace Schenatto Pereira Moraes. Co-orientadora: Maristela de Oliveira Poletini.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Acetilcolina - Teses. 2. Comportamento social. 3. Agressividade (Psicologia) - Teses. 4. Hipotálamo - Teses. 5. Núcleo do leito da estria terminal. 6. Septo lateral. 7. Vasopressina - Teses. 8. Fisiologia - Teses. I. Moraes, Grace Schenatto Pereira. II. Poletini, Maristela de Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Fisiologia e Farmacologia



## "MODULAÇÃO COLINÉRGICA DE COMPORTAMENTOS SOCIAIS EM CAMUNDONGOS"

**VINÍCIUS ELIAS DE MOURA OLIVEIRA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 27 de julho de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**PROFA. DR<sup>a</sup>. MARISTELA DE OLIVEIRA POLETINI**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**PROFA. DR<sup>a</sup>. DANIELE CRISTINA DE AGUIAR**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**PROFA. DR<sup>a</sup>. FABIOLA MARA RIBEIRO**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**PROFA. DR<sup>a</sup>. GRACE SCHENATTO PEREIRA MORAES**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 27 de julho de 2015

*À minha mãe, a mulher mais inteligente e corajosa que conheço. Aquela que me ensinou que nada é impossível, e que foi a luz me guiando por todo esse caminho.*

## **Agradecimentos**

*À Profª Grace Schenatto Pereira Moraes, por confiar esse projeto a mim e por ser uma constante fonte de inspiração. Por me ajudar a “esvaziar a minha carroça”, por ser uma conselheira e uma amiga. Obrigado por reconhecer o meu potencial. Você continua sendo “um divisor de águas na minha carreira”!!*

*À Profª Maristela de Oliveira Poletini, pelos valiosos conselhos e orientações, mas também pela sinceridade (rsrsrsrs...). Obrigado, Maris, por me fazer conhecer uma das minhas paixões, a neuroendocrinologia.*

*À Luciana por participar da construção de cada resultado desse trabalho, pela eterna amizade. Por me ouvir, aconselhar e por ser a melhor amiga que alguém pode querer. Você é simplesmente brilhante e ainda continua sendo uma das melhores escolhas da minha vida!!! Te amo Lu!!!*

*À Marina por me ajudar nessa última fase do trabalho, por compreenderme quando nem eu mesmo conseguia. Por ser uma amiga, conselheira uma linda. Sou seu fã Hahahha Ao Mauro pelas discussões ao longo do mestrado. Por puxar minha orelha o tempo todo. Por ser meu melhor amigo, my person, por estar sempre ao meu lado. Por me incentivar a correr atrás dos meus sonhos. Por fazer de mim uma pessoa melhor. Saudades...*

*À Hyorrana pela amizade e pelo carinho. Cada lágrima e cada sorriso foram muito mais saborosos ao seu lado amiga. Amo você ou como você diria S2.*

*À Thaís e Nayara que chegaram pra ficar no meu coração. Por tornarem os meus dias memoráveis!! Pelas risadas, “tapas na cara” e por serem meu aconchego!!! Tha você tornou cada dia meu mais leve e mais cheio de alegria. Enquanto, a Nay foi uma mãezona sempre cuidadosa e companheira, obrigado*

*pelas várias horas de estudo na FACE. Como vou viver sem vocês? Lindas!!*

*Amo vocês!!*

*A todos os colegas do NNC e da pós-graduação. Em especial a Duda, Caio, Onésia, Talita, Marcelo, Gabi, André, Thomaz, Léo, Ana Raquel, Flávio, Simões, Hércules, Cristiane, Thaís, Carol, Cibele, Mariana, Vanessa e Diogo, obrigado por toda a ajuda.*

*A todos os professores dos departamentos de fisiologia e farmacologia pelos ensinamentos. Principalmente, aos professores do NNC Márcio, André, Juliana e Bruno, também aos professores laboratório de endocrinologia e metabolismo Cândido, Adelina e Rafael e as professoras Sílvia e Cristina Guatimosin por toda a ajuda durante o desenvolvimento desse projeto.*

*Aos secretários da pós-graduação Rodner, Cintya e Nilda pela preciosa ajuda em momentos de desespero. À minha família por estar sempre ao meu lado me apoiando.*

*À minha mãe por ser aquela que sempre reconheceu meu potencial e me incentivou, por ser minha heroína. Ao meu pai por todo carinho dedicado a mim. Ao Carlos e à Walquiria por serem os amores da minha vida.*

*As agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG por fornecerem o financiamento para que esse projeto fosse executado.*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Sistema olfativo de roedores.....	23
Figura 2 Via Neural da Agressividade no encéfalo de roedores.....	26
Figura 3 Sistema Colinérgico.....	30
Figura 4 Sinapse Colinérgica.....	31
Figura 5 Sistema Vasopressinérgico.....	36
Figura 6 Teste de Residente intruso em VACHT KD.....	62
Figura 7 Teste de residente intruso, confronto com uma fêmea SWISS OVX, em VACHT KD.....	63
Figura 8 Teste de Residente Intruso, confronto com um animal anestesiado em VACHT KD.....	64
Figura 9 Teste de Competição pela Comida (FCT) em VACHT KD.....	65
Figura 10 Sociabilidade, Dominância e Impulsividade em VACHT KD.....	66
Figura 11 Atividade Locomotora em VACHT KD.....	67
Figura 12 Peso relativo da glândula adrenal em VACHT KD.....	67
Figura 13 Efeito da galantamina sobre o comportamento agressivo de VACHT KD.....	69
Figura 14 Efeito da redução aguda do tônus colinérgico sobre o comportamento social de camundongos.....	70
Figura 15 Teste de Residente intruso em ChAT-ChR2-EYFP.....	72
Figura 16 Sociabilidade e Atividade Locomotora em ChAT-ChR2-EYFP.....	73
Figura 17 Interação Social, Sociabilidade e Atividade Locomotora após o aumento agudo do tônus colinérgico.....	74
Figura 18 Expressão de marcadores colinérgicos no hipotálamo de camundongos isolados.....	75

Figura 19 Expressão de ChAT no PVN de camundongos isolados .....	76
Figura 20 Expressão de ChAT no SON de camundongos isolados .....	77
Figura 21 Expressão de ChAT no AH de camundongos isolados.....	78
Figura 22 Expressão de ChAT no LH de camundongos isolados .....	78
Figura 23 Níveis hipotalâmicos de ACh e Ch em camundongos isolados .....	79
Figura 24 Efeito da galantamina sobre o comportamento agressivo de camundongos isolados.....	81
Figura 25 Efeito do isolamento social de 1 semana sobre o comportamento social de ChAT-ChR2-EYFP .....	82
Figura 26 Efeito do isolamento social de 2 semanas sobre o comportamento social de ChAT-ChR2-EYFP .....	83
Figura 27 Efeito do isolamento social de 3 semanas sobre o comportamento social de ChAT-ChR2-EYFP .....	85
Figura 28 Efeito temporal do isolamento social sobre o comportamento social de ChAT-ChR2-EYFP .....	87
Figura 29 Expressão de AVP e c-Fos no PVN de camundongos VChT KD pós RI.....	89
Figura 30 Expressão de AVP e c-Fos no SON de camundongos VChT KD que pós RI.....	91
Figura 31 Expressão de AVP e c-Fos no LH de camundongos VChT KD pós RI .....	93
Figura 32 Expressão de AVP e c-Fos no AH de camundongos VChT KD pós tarefa de RI.....	95
Figura 33 Expressão de AVP c-Fos no BNST de camundongos VChT KD pós tarefa de RI.....	97

Figura 34 Expressão de AVP e c-Fos no LSv de camundongos VChT KD pós tarefa de RI.....	99
Figura 35 Efeito do SR49059 sobre o comportamento agressivo de camundongos KD <sup>HET</sup> .....	101

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1 Resumo dos resultados.....	102
-------------------------------------	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChR	Receptor de Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADH	Hormônio Anti-Diurético
AH	Hipotálamo anterior
AOB	Bulbo Olfatório Acessório
AON	Núcleo Olfatório Anterior
AOS	Sistema Olfativo Acessório
AVP	Vasopressina
AVPR	Receptor de Vasopressina
BF	Prosencéfalo Basal
BLA	Amígdala Basolateral
BNST	Núcleo do Leito da Estria Terminal
CeA	Amígdala Central
ChAT	Colina Acetiltransferase
ChAT- ChR2- EYFP	Camundongo que super-expressa o VAcHT
ChT	Transportador de Alta Afinidade para o Íon Colina
Ch <sup>+</sup>	Íon Colina
DA	Dopamina
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EC	Córtex Entorrinal
ERK	Proteína Cinase Reguladora de Sinal Extracelular
FCT	Teste de Competição pela Comida
GAL	Galantamina
H	Hipotálamo
HAA	Área Hipotalâmica de Ataque
hdB	Núcleo Límbico Horizontal da Banda Diagonal de Broca

Hip	Hipocampo
HHA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HHG	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
IP <sub>3</sub>	Inositol (3,4, 5)- trifosfato
JNM	Junção Neuromuscular
KD <sup>HET</sup>	Camundongo knockdown heterozigoto para o VACHT
KD <sup>HOM</sup>	Camundongo knockdown homozigoto para o VACHT
LA	Amígdala Lateral
LS	Septo Lateral
LDTg	Tegmento Laterodorsal Pontino
LTP	Potenciação de Longa-Duração
MeA	Amígdala Medial
mAChR	Receptor Muscarínico
MOB	Bulbo Olfatório Principal
MOE	Epitélio Olfativo Principal
MOS	Sistema Olfativo Principal
MPOA	Área Pré-óptica Medial
MS	Núcleo Septal Medial
NAcc	<i>Núcleo Accumbens</i>
nAChR	Receptor Nicotínico
nbm	Núcleo Basal Magnocelular
NSF	Teste de Supressão da Novidade pela Comida
OFC	Córtex Orbitofrontal
OT	Ocitocina
OTU	Tubérculo Olfatório
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
PC	Córtex Piriforme

PFC	Córtex Pré-frontal
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato
PLC	Fosfolipase C
PKC	Proteína Quinase C
PPTg	Núcleo Tegmental Pedúnculo-Pontino
PV	<i>Pallidum Ventral</i>
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
RI	Teste de Residente Intruso
SNC	Sistema Nervoso Central
SVZ	Zona Sub-ventricular
V1a	Receptor de Vasopressina do tipo 1a
V1b	Receptor de Vasopressina do tipo 1b
V2	Receptor de Vasopressina do tipo 2
VAcHT	Transportador Vesicular de Acetilcolina
VAcHT KD	Camundongo Knockdown para o Transportador Vesicular de Acetilcolina
vdB	Núcleo Límbico Vertical da Banda Diagonal de Broca
VMH	Hipotálamo Ventromedial
VMHvl	Hipotálamo Ventromedial porção ventro-lateral
VNO	Órgão Vomeronasal
VTA	Área Tegmentar Ventral
5-HT	Serotonina

## Sumário

1	RESUMO .....	19
2	ABSTRACT .....	20
3	Introdução .....	21
3.1	Comportamento social.....	21
3.1.1	Processamento da Informação Social.....	21
3.1.2	Agressividade.....	24
3.1.3	Comportamento de Afiliação .....	27
3.2	Sistema Colinérgico.....	28
3.2.1	Sistema Colinérgico e Comportamento Social .....	31
3.2.2	Animais Geneticamente Modificados .....	32
3.3	Vasopressina.....	34
3.3.1	Vasopressina e Comportamento Social .....	36
3.3.2	Vasopressina e Acetilcolina .....	38
4	Objetivos .....	40
4.1	Objetivo Geral.....	40
4.2	Objetivos Específicos .....	40
5	Justificativa.....	43
6	Materiais e Métodos.....	44
6.1	Animais Experimentais .....	44
6.2	Tarefas Comportamentais .....	44
6.2.1	Teste de Residente Intruso .....	44
6.2.2	Teste de Competição pela Comida (FCT).....	45
6.2.3	Teste de Sociabilidade e Preferência pela Novidade Social	46
6.2.4	Teste de Dominância no Tubo .....	46
6.2.5	Teste de Supressão da Novidade pela Comida (NSF).....	47

6.2.6	Atividade Locomotora.....	47
6.3	Drogas.....	48
6.4	Imunohistoquímica .....	48
6.5	Western Blot.....	50
6.6	Imunofluorescência .....	51
6.7	Ensaio Fluorimétrico para Detecção de Acetilcolina.....	53
6.8	Cirurgia Estereotáxica .....	54
6.9	Histologia.....	55
6.10	Estatística.....	55
6.11	Delineamento Experimental .....	56
6.11.1	Efeito da hipofunção colinérgica sobre o comportamento agressivo, locomotor e resposta ao estresse .....	56
6.11.2	Efeito da hipofunção colinérgica sobre a sociabilidade, dominância e impulsividade de camundongos.....	56
6.11.3	Efeito da hipofunção colinérgica sobre a agressividade reativa e controlada de camundongos .....	57
6.11.4	Efeito da galantamina sobre o comportamento agressivo e atividade locomotora de camundongos com hipofunção colinérgica .....	57
6.11.5	Efeito da hipofunção colinérgica sobre a atividade neural, ativação de neurônios vasopressinérgicos e expressão de vasopressina	58
6.11.6	Efeito do SR49059 sobre o comportamento agressivo de camundongos KD <sup>HET</sup> .....	58
6.11.7	Efeito agudo da redução do tônus colinérgico sobre o comportamento social de camundongos.....	58
6.11.8	Efeito da hiperfunção colinérgica sobre o comportamento social e atividade locomotora de camundongos.....	59
6.11.9	Efeito do aumento agudo do tônus colinérgico sobre o comportamento social de camundongos.....	59

6.11.10	Efeito da galantamina sobre o comportamento agressivo de camundongos isolados.....	59
6.11.11	Efeito do isolamento social sobre a expressão de ChAT e os níveis de ACh hipotalâmicos.....	60
6.11.12	Efeito da hiperfunção colinérgica em bloquear o aumento do comportamento agressivo induzido pelo isolamento social.....	60
7	RESULTADOS .....	61
7.1	Animais com hipofunção colinérgica apresentam comportamento agressivo exacerbado.....	61
7.2	Animais com hipofunção colinérgica apresentam agressividade instrumental mas não anormal.....	62
7.3	Animais com hipofunção colinérgica não apresentam alterações no comportamento de sociabilidade, dominância, impulsividade ou locomoção.....	65
7.4	Animais com hipofunção colinérgica não apresentam resposta ao estresse alterada .....	67
7.5	Galantamina recupera os efeitos da hipofunção colinérgica sobre a agressividade em camundongos .....	68
7.6	Redução aguda do tônus colinérgico aumenta a interação social e atividade locomotora de camundongos .....	70
7.7	Animais com hiperfunção colinérgica apresentam o comportamento afiliativo exacerbado .....	71
7.8	Animais com hiperfunção colinérgica apresentam sociabilidade mas não locomoção exacerbada.....	72
7.9	Aumento agudo do tônus colinérgico diminui a interação social e atividade locomotora de camundongos .....	73

7.10 Isolamento social aumenta a expressão de ChAT no hipotálamo de camundongos .....	74
7.11 Isolamento social não tem efeito sobre os níveis de acetilcolina hipotalâmicos.....	79
7.12 Galantamina reduz a agressividade de camundongos isolados.....	79
7.13 Camundongos hipercolinérgicos são protegidos dos efeitos do isolamento social na agressividade .....	82
7.14 Hipofunção colinérgica exacerba a atividade de neurônios vasopressinérgicos e a expressão de vasopressina no hipotálamo, BNST e septo lateral de camundongos.....	88
7.15 Bloqueio dos receptores V1a no BNST diminui a agressividade de KD <sup>HET</sup>	100
7.16 Resumo dos resultados principais.....	102
8 Discussão.....	103
9 CONCLUSÃO .....	115
10REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

## 1 RESUMO

Comportamentos sociais são a base biológica para o estabelecimento de hierarquia, reconhecimento de parceiros, disputa por território, afiliação e cuidado parental. Logo, a sobrevivência do indivíduo e a preservação da espécie dependem da manutenção adequada destes comportamentos. No entanto as bases moleculares envolvidas na expressão de comportamentos sociais ainda não estão completamente elucidadas. A acetilcolina (ACh) é um importante modulador da acuidade olfativa e da formação da memória social. Entretanto seu papel na regulação do comportamento social, em especial na polarização entre agressão e afiliação ainda não foi estabelecido. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel do tônus colinérgico sobre o comportamento social de camundongos, verificando também suas implicações sobre o hormônio pró-agressivo vasopressina. Verificamos que uma redução do tônus colinérgico amplifica o comportamento agressivo de camundongos, sendo este revertido pela infusão de galantamina (GAL), inibidor da acetilcolinesterase. Essa agressividade depende do aumento da expressão de vasopressina e da atividade de neurônios vasopressinérgicos nos núcleos paraventricular (PVN), supra-óptico (SON), lateral (LH), anterior (AH) do hipotálamo, do leito da estria terminal (BNST) e do septo lateral ventral (LSv). Além disso, verificamos que a agressividade induzida pelo isolamento social em camundongos é revertida por um aumento da biodisponibilidade de ACh e que esses animais apresentam um aumento na expressão da enzima colina acetiltransferase (ChAT) no hipotálamo. Já animais com aumento do tônus colinérgico apresentam comportamento pró-social amplificado. Sumarizando, nossos resultados mostram que alterações na disponibilidade de ACh geram oscilações no comportamento social. Sendo o comportamento agressivo dependente da interação entre os sistemas colinérgico e vasopressinérgico.

**Palavras-Chave:** Acetilcolina, Comportamento Social, Agressividade, Hipotálamo, Núcleo do Leito da Estria Terminal, Septo Lateral e Vasopressina

## 2 ABSTRACT

Social behavior is essential for hierarchy, mating, territorial aggression, affiliation and parental care. Thus, the species survival depends of this behavior. However, so far, the molecular basis of social behavior has not been elucidated. Acetylcholine (ACh) is an important modulator of olfactory discrimination and social memory acquisition. Nevertheless, the role of the cholinergic system on social behavior, especially in the polarization between aggression and affiliation, has not been established. Thus, our aim was to evaluate the role of the cholinergic tonus on the modulation of social behavior, analyzing its implication for vasopressin (the pro-aggressive hormone). We verified that cholinergic hypofunction increased aggressive behavior. This phenotype was reversed by galantamine (GAL), acetylcholinesterase inhibitor. In these animals, aggression was dependent of AVP expression and vasopressinergic neurons activity in the hypothalamus (paraventricular, supraoptic, lateral and anterior nucleuses), bed nucleus of stria terminalis and ventral lateral septum. Interesting, we saw that an increase in ACh levels blocked the arising of aggression in isolated animals. Social isolation increases the choline acetyltransferase (ChAT) expression in the hypothalamus. On the other hand, hypercholinergic animals presented increases on affiliation. In conclusion, our results showed that oscillations on cholinergic tonus can modulate social behavior. Furthermore, aggressiveness induced by cholinergic hypofunction is dependent on vasopressinergic system activity.

**Keywords:** Acetylcholine, Aggression, Bed Nucleus of Stria Terminalis, Hypothalamus, Lateral Septum, Social Behavior and Vasopressin.

### 3 INTRODUÇÃO

#### 3.1 Comportamento social

Comportamento social é definido como o comportamento que emerge da interação entre co-específicos. Esse comportamento apresenta um forte cunho evolutivo, uma vez que está presente ao longo de toda a filogenia. Mesmo organismos relativamente “simples” como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Apis mellífera* apresentam comportamentos extremamente elaborados. Além disso, tanto fatores genéticos como ambientais podem alterar a expressão de comportamentos sociais (Sokolowski 2010).

De forma geral, os comportamentos sociais são divididos em dois ramos: comportamentos de “cuidado e ser amigável” e comportamentos “de luta ou fuga”. O primeiro está envolvido com comportamentos reprodutivos (comportamento sexual, corte e cuidado parental) e de afiliação (interação e reconhecimento social). Já o segundo grupo remete a comportamentos agonísticos (dominância, submissão, predação e agressividade). Pouco ainda se sabe sobre as bases neuronais e neuroendócrinas desses comportamentos. De modo que, entender como o sistema nervoso central (SNC) codifica a informação social e como se dá a transição entre as diferentes nuances desse comportamento permanece como um dos desafios da neurociência (Insel 2010).

##### 3.1.1 Processamento da Informação Social

Em roedores, a informação social, predominantemente feromônios, é captada principalmente pela via olfativa (Mucignat-Caretta 2010). As moléculas de feromônios são consideradas como “pistas” químicas emitidas e detectadas por indivíduos da mesma espécie, que são capazes de influenciar

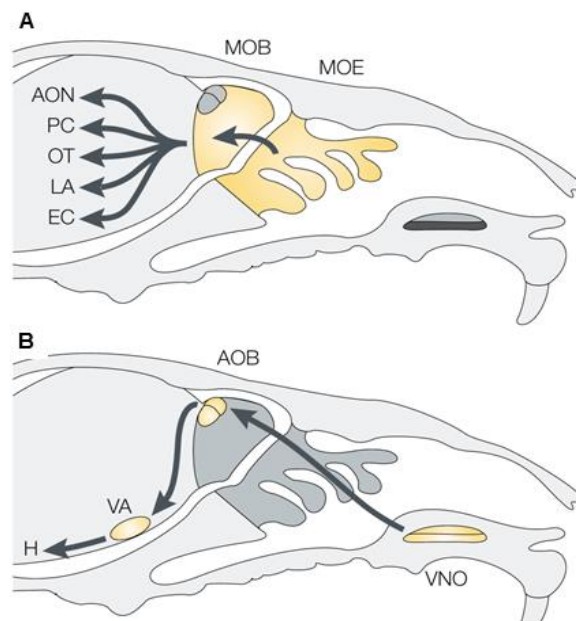
comportamentos sociais inatos, alterando a atividade neural e respostas neuroendócrinas, como os eixos hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG) e hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (Stowers and Marton 2005).

Tanto feromônios quanto outros odores e moléculas sociais são captados por dois sistemas distintos: o Sistema Olfativo Principal (MOS, do inglês *Main Olfactory System*) e o Sistema Olfativo Acessório (AOS, do inglês *Acessory Olfactory System*) (Mucignat-Caretta 2010).

O MOS é composto pelo epitélio olfativo principal (MOE, do inglês *Main Olfactory Epithelium*), cujos neurônios glutamatérgicos projetam para o bulbo olfatório principal (MOB, do inglês *Main Olfactory Bulb*), acredita-se que esse sistema é o responsável por captar odores voláteis sejam eles sociais ou não. Após a codificação da informação sensorial no MOB esta é enviada para regiões de processamento primário como o tubérculo olfatório e o núcleo olfatório anterior sendo também enviada para regiões como os córtices piriforme (PC, do inglês *Piriform Cortex*) e entorrinal (EC, do inglês *Entorhinal Cortex*) e para a amígdala lateral (LA, do inglês *Lateral Amygdala*) (Dulac and Torello 2003; Mucignat-Caretta 2010) (Figura 1).

Já o AOS é composto pelo órgão Vomeronasal, cujo epitélio é constituído por células ciliadas e uma bomba de muco que banha o tecido permitindo que os estímulos não voláteis e peptídeos, identificados por esse sistema, sejam dissolvidos no lúmen onde os dendritos de neurônios bipolares (glutamatérgicos) serão capazes de transduzir a informação química em elétrica, enviando-a, subsequentemente, para o bulbo olfatório acessório. Após esse processamento inicial, a informação é enviada principalmente para duas regiões, o hipotálamo (H), responsável pelas respostas neuroendócrinas envolvidas nos

comportamentos sociais, e a amígdala vomeronasal, essa região inclui a amígdala medial (MeA), o núcleo do leito da estria terminal (BNST, do inglês *Bed Nucleus of the Stria Terminalis*) e outras porções da amígdala cortical (Dulac and Torello 2003; Mucignat-Caretta 2010) (Figura 1).



**Figura 1 Sistema olfativo de roedores.** Em A esta representado o sistema olfativo principal. Os estímulos voláteis são captados pelo epitélio olfativo principal (MOE), em seguida a informação é processada pelo bulbo olfatório principal (MOB). Posteriormente, sendo integrada ao restante da via olfativa como núcleo olfatório anterior (AON), os córtices piriforme (PC) e entorinal (EC), o tubérculo olfativo e a amígdala lateral (LA). Em B esta representado o sistema olfativo acessório. Os estímulos não-voláteis são captados pelo órgão vomeronasal e posteriormente são enviadas para o bulbo olfatório acessório (AOB) que projeta para a amígdala vomeronasal (VA) e para o hipotálamo (H). Adaptado de Dulac e Torello (2003).

Muitos substratos neurais estão envolvidos em algum nível com a gênese de comportamentos sociais. Entretanto, experimentos de lesão, com genes de expressão imediata (*c-fos*) e com modulação farmacológica apontam sete estruturas como protagonistas nesse cenário: a MeA, o BNST, o hipotálamo anterior (AH), a porção ventrolateral do hipotálamo ventro-medial (VMHvl), a área pré-óptica medial (MPOA), o septo lateral (LS) e a substância cinzenta periaquedutal (PAG, do inglês *Periaqueductal Grey*). Todas essas estruturas

apresentam-se conectadas bidirecionalmente, participam de mais de uma modalidade de comportamento social e são responsivas a hormônios sexuais (grandes moduladores do cérebro social). Apesar disso, vale ressaltar que todas essas regiões apresentam diversos sistemas neuroquímicos e que as subpopulações neuronais podem contribuir para as diferentes nuances do comportamento social (Newman 1999; Goodson 2005).

### 3.1.2 Agressividade

Agressividade é o termo genérico utilizado para definir comportamentos que tem como objetivo infligir um dano físico a outro indivíduo. Comportamentos agressivos são filogeneticamente muito antigos, sendo, portanto, indispensáveis para sobrevivência. Uma vez que, são essenciais para a aquisição e manutenção de recursos como alimento, território e mesmo um parceiro sexual. Em roedores, o perfil comportamental de agressão inicia-se com a exploração olfativa (ânus-genital principalmente) seguida por comportamentos de perseguição que culminam com um confronto que abrange mordidas, o comportamento de “boxing” e posturas ofensivas (Nelson and Trainor 2007).

De modo geral comportamentos agressivos são divididos de forma diferente nos humanos e nos demais animais. Nos humanos a agressividade é classificada em dois tipos: **instrumental-controlada**, que é estímulo dependente, sempre desencadeada visando um objetivo final, associada principalmente a homicídios, genocídios e a violência em geral, e a **reativa-impulsiva** que é estímulo independente associada principalmente a psicopatologias (como esquizofrênia, transtornos de personalidade e transtorno explosivo intermitente, etc.) (Nelson and Trainor 2007). Já nos animais, a agressividade é classificada de acordo com os indivíduos envolvidos e com o

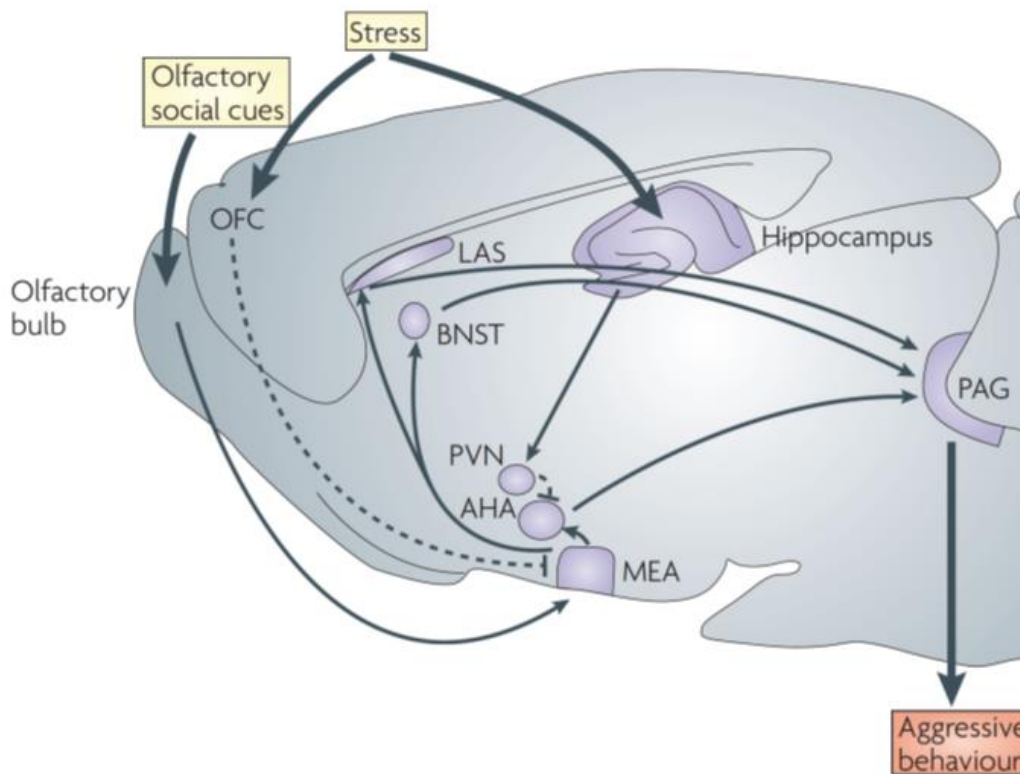
objetivo da disputa sendo, portanto: maternal, entre machos, territorial, entre fêmeas, predatória, induzida pelo medo, etc. (Comai, Tau et al. 2012).

Modelos animais podem mimetizar a agressividade reativa de humanos sendo essa então denominada agressividade anormal. Para pertencer a esse subgrupo o animal deve satisfazer quatro critérios: Discrepância entre ataque e provocação (ataca muito e em situações inapropriadas); Falta de regras espécie-específicas (ataque a indivíduos que não oferecem perigo, fêmeas, machos castrados e juvenis); Insensibilidade aos sinais sociais do oponente (ataque continua mesmo depois do oponente se render); Ambiguidade ofensiva (ataque a indivíduos pouco ameaçadores, mas não a ameaçadores).

A agressão anormal por sua vez é dividida em afetiva, intraespecífica (dependente da área de ataque hipotalâmica, o hipotálamo mediobasal) e a interespecífica ou predatória (dependente do hipotálamo lateral). Entretanto o hipotálamo lateral também participa da agressividade controlada e intraespecífica em algumas espécies como camundongos e hamsters (Haller 2013).

O circuito neural da agressividade é similar ao de outros comportamentos sociais. As estruturas envolvidas são: MPOA, MA, BNST, LS, AH, VMH e a PAG. Acredita-se que a informação olfativa captada pelo bulbo olfatório seja integrada na amígdala medial que projeta para o BNST, LS, e AH. Essas estruturas enviam projeções para a PAG, que gera os padrões motores envolvidos na expressão comportamental da agressividade. Regiões cerebrais como o córtex orbitofrontal (OFC), o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o hipocampo (Hip) também desempenham papel nessas respostas, sendo o córtex pré-frontal um inibidor da agressão (Nelson and Trainor 2007) (Figura 2). Estudos recentes tem

mostrado ainda o papel indispensável do VMHvl na gênese de comportamentos agressivos (Lin, Boyle et al. 2011).



**Figura 2 Via Neural da Agressividade** no encéfalo de roedores. A informação é captada pelo bulbo olfatório sendo então processada na amígdala medial (MEA), esta por sua vez projeta para a área hipotalâmica anterior (AHA) e para o núcleo do leito da estria terminal (BNST) e septo lateral (LS). Posteriormente a informação é enviada para a substância cinzenta periaquedutal (PAG) que da origem a expressão do comportamento agressivo. Em resposta ao estresse regiões como o córtex orbitofrontal (OFC), o hipocampo e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) podem inibir o comportamento agressivo, Adaptado de Nelson e Trainor (2007).

Quanto à neuroquímica, vários neurotransmissores, hormônios e neuro-hormônios se relacionam com a origem de comportamentos agressivos. Dentre eles podemos citar: a dopamina (DA) (Beiderbeck, Reber et al. 2012), a serotonina (5-HT) (Lesch, Araragi et al. 2012), a vasopressina (AVP) (Veenema, Beiderbeck et al. 2010), a ocitocina (OT) (de Jong, Beiderbeck et al. 2014) e os hormônios sexuais (Yang, Chiang et al. 2013; Lee, Kim et al. 2014).

Pouco ainda se sabe sobre as bases moleculares e vias de sinalização intracelular envolvidas na agressividade. Entretanto um trabalho recente que

utilizou fatias de hipocampo de ratos e camundongos knockouts para o receptor V1b de vasopressina mostrou que é possível que a gênese da agressividade seja dependente da geração de potenciação de longa duração (LTP) no CA2 hipocampal (Pagani, Zhao et al. 2015). Além disso, muitos pesquisadores acreditam que os mecanismos geradores da agressividade são tanto mecanismos rápidos independentes de transcrição gênica como mecanismos mais lentos dependentes de transcrição e síntese proteica (Trainor, Lin et al. 2007). Alguns trabalhos, apontam ainda o aumento da fosforilação da proteína cinase reguladora de sinal extracelular (ERK) na MeA, BNST e área hipotalâmica de ataque (HAA), após o encontro agonístico (Trainor, Crean et al. 2010; de Jong, Beiderbeck et al. 2014).

### **3.1.3 Comportamento de Afiliação**

Pouco ainda se conhece sobre o comportamento de afiliação, visto que existe uma carência de modelos animais na literatura para se estudar esse tipo de comportamento. Sumarizando o comportamento de afiliação ou pro-social pode ser entendido como a interação social não-agressiva entre indivíduos da mesma espécie, envolvido com a formação de pares, com o cuidado parental e com a defesa da prole (Insel 2010).

O principal modelo para se entender o comportamento de afiliação é o arganaz da pradaria (*Microtus ochrogaster*). Essa espécie é monogâmica, apresenta cuidado parental e formação de pares, além de ser extremamente sociável quando comparada a outros modelos animais como ratos e camundongos. Acredita-se que o circuito neural envolvido com a formação de pares e, portanto com a afiliação, relaciona-se, principalmente, com três circuitos neuroquímicos: vasopressinérgico, ocitocinérgico e dopaminérgico. Receptores

de vasopressina (AVPR) são mais expressos no *pallidum ventral* (PV) de machos. Enquanto, em fêmeas, receptores de ocitocina são mais expressos no córtex pré-frontal (PFC) e núcleo accumbens (NAcc). Além disso, esses animais apresentam um aumento na expressão de receptores D2 e na concentração de dopamina no NAcc. (McGraw and Young 2010).

Um trabalho recente mostra aumento da atividade de neurônios dopaminérgicos da área tegmentar ventral (VTA) em resposta ao estímulo social, sendo essa atividade amplificada na presença de um estímulo social novo. Além disso, a estimulação ou inibição da VTA aumenta ou diminui, respectivamente a interação social, alterando também a expressão de c-Fos no NAcc (Gunaydin, Grosenick et al. 2014). Outro trabalho mostra que a ativação de receptores de glicocorticoides (GC), em neurônios sensíveis à dopamina do núcleo accumbens, é necessária para que o animal gere o comportamento de aversão social pós-estresse social crônico (Barik, Marti et al. 2013). Resumindo, diversos sistemas estão envolvidos com o surgimento da afiliação e pouco ainda se sabe como é feita a codificação do comportamento pró-social em roedores.

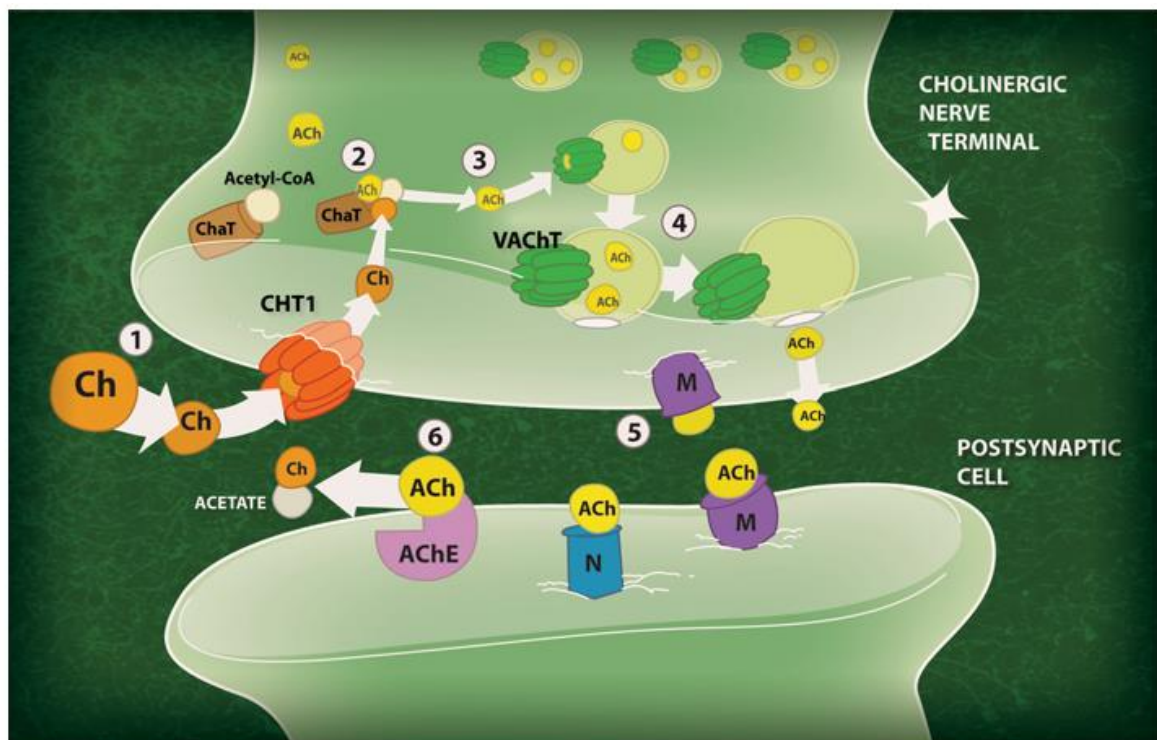
### **3.2 Sistema Colinérgico**

A Acetilcolina (ACh) é um dos principais neurotransmissores no SNC e atua na junção neuromuscular, sistema autonômico e no cérebro, modulando a habilidade cognitiva. Em nível central a ACh também pode atuar como um neuromodulador modificando a plasticidade sináptica através de alterações na excitabilidade neural, liberação pré-sináptica de neurotransmissores e taxa de disparo de núcleos neuronais (Picciotto, Higley et al. 2012).

No SNC, os neurônios colinérgicos se encontram de duas formas: concentrados em núcleos colinérgicos ou entre outros tipos neuronais sob a forma de interneurônios (Picciotto, Higley et al. 2012). Os núcleos de neurônios colinérgicos se dividem principalmente em dois grupos: o **prosencefalo basal (BF)** e os **núcleos do tronco-encefálico**. O prosencefalo basal é composto pelos núcleos septal medial (MS), núcleo límbico vertical (vdB) e horizontal (hdB) da banda diagonal de Broca e o núcleo basal magnocelular (nbm) também chamado de núcleo de Meynert. Os neurônios do BF são responsáveis por inervar regiões como o néocortex, a amígdala basolateral (BLA), o hipocampo, o córtex cingulado e o bulbo olfatório, sendo implicados no controle de atividades como percepção sensorial, aprendizagem, memória e atenção. Os núcleos do tronco encefálico são formados por dois grupos neuronais: núcleo tegmental pedúnculo-pontino (PPTg) e tegumento laterodorsal pontinho (LDTg). Esses projetam para VTA, tálamo e hipotálamo sendo implicados respectivamente, no controle do sistema de recompensa, ciclo sono e vigília e ingestão alimentar (Everitt and Robbins 1997; Picciotto, Higley et al. 2012) (Figura 3).



degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (Clarkson, Bahr et al. 1993; Rand 2007; Prado, Roy et al. 2013) (Figura 4).



**Figura 4 Sinapse Colinérgica.** A colina (Ch) é captada da fenda sináptica pelo transportador de alta afinidade pela colina (CHT1), em seguida o radical acetila da molécula de Acetil-CoA é ligado à Ch pela ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT), dando origem a acetilcolina (ACh). A molécula de ACh é estocada em vesículas pelo transportador vesicular de acetilcolina (VChT). Após a liberação na fenda sináptica a ACh pode se ligar a receptores nicotínicos (N) e/ou muscarínicos (M), sendo degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE). Adaptado de Prado e Colaboradores (2013).

### 3.2.1 Sistema Colinérgico e Comportamento Social

Vários trabalhos já mostram o envolvimento do sistema colinérgico em comportamentos sociais. A ACh é essencial para a aquisição e discriminação de odores (Linster, Garcia et al. 2001; Chaudhury, Escanilla et al. 2009) e para a aquisição de memórias olfativas (Pavesi, Gooch et al. 2013) e sociais (Prado, Martins-Silva et al. 2006). Entretanto, pouco ainda se sabe como esse neurotransmissor modula comportamentos sociais como a agressividade e a afiliação.

Trabalhos farmacológicos com ratos isolados mostram que a escopolamina, um antagonista muscarínico, diminui o comportamento agressivo

de ratos machos contra fêmeas ovariectomizadas (OVX) e outros machos. E que a galantamina (GAL), inibidor da acetilcolinesterase, aumenta a agressividade no mesmo modelo (Winslow and Camacho 1995). Por outro lado, existe uma vertente na literatura que aponta o papel da ACh, via nAChRs, em reduzir a agressividade em diversos modelos animais e em diferentes formas de agressão (Picciotto, Lewis et al. 2015). Por exemplo, a nicotina reduz tanto o tempo de ataque quanto o número de mordidas, em um modelo de agressividade induzido por choque na pata (Johnson, Carlson et al. 2003). Além disso, a infusão de nicotina também diminuiu o comportamento de muricídio (*mouse-killing*) em ratos, sendo esse efeito revertido por antagonistas nicotínicos administrados central ou periféricamente (Waldbillig 1980). Em humanos, um estudo de caso mostra que a administração de nicotina por via transdermal também reduziu o comportamento agressivo no paciente JC, que apresentava autismo (Van Schalkwyk, Lewis et al. 2015).

De maneira geral, pouco ainda se sabe como o tônus colinérgico altera o comportamento agressivo e afiliativo, provavelmente porque poucos estudos combinam ferramentas crônicas e agudas de alteração do tônus colinérgico e modelos clássicos de agressividade para entender a participação da acetilcolina na gênese e manutenção destes comportamentos.

### **3.2.2 Animais Geneticamente Modificados**

Estudos apontam que a expressão do VACHT é correlacionada positivamente com a liberação de ACh tanto no SNC, quanto na junção neuromuscular. Camundongos tratados com vesamicol, um inibidor do VACHT, apresentam redução dos níveis de liberação de acetilcolina (Van der Kloot 2003). Do mesmo modo, camundongos knockout para o VACHT (VACHT KO)

homozigotos não sobrevivem, enquanto os heterozigotos apresentam apenas 50% de expressão do VACHT (Prado, Martins-Silva et al. 2006; de Castro, De Jaeger et al. 2009). Semelhantemente, camundongos knockdown para o VACHT (VACHT KD), heterozigotos (VACHT KD<sup>HET</sup>) e homozigotos (VACHT KD<sup>HOM</sup>), apresentam 45% e 65% de redução no VACHT, respectivamente. Animais heterozigotos apresentam redução na liberação de ACh de aproximadamente 35% no córtex frontal e de 31% no estriado (Prado, Martins-Silva et al. 2006).

Os animais VACHT KD<sup>HOM</sup> constituem um bom modelo para estudos relacionados a déficits colinérgicos na junção neuromuscular. De fato, já foi demonstrado que estes animais apresentam pior desempenho em tarefas motoras como rotarod, grip-force e wire-hang, quando comparado ao selvagem (WT) e VACHT KD<sup>HET</sup>. Por outro lado, camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> não apresenta déficits motores, mais sim cognitivos, sendo um bom modelo para estudos de modulação colinérgica da cognição. Animais VACHT KD<sup>HET</sup> apresentam prejuízo na memória de curta e de longa duração de reconhecimento de objetos e na memória social, embora não apresentem déficits olfativos no teste do chocolate. Além de levarem mais tempo para aprender a tarefa motora de rotarod quando comparados aos WT (Prado, Martins-Silva et al. 2006; de Castro, De Jaeger et al. 2009).

Em 2011, um outro modelo colinérgico de camundongo geneticamente modificado foi desenvolvido. Neste animal foi inserido um cromossomo bacteriano artificial (BAC) associado ao promotor do gene da ChAT, ao qual também foi associado um gene da rodopsina ChR2. O objetivo dessa manipulação foi utilizar a técnica de optogenética para manipular a transmissão

colinérgica. Entretanto, associado ao gene que codifica a ChAT está o gene que codifica o VACHT. Essas manipulações acabaram originando um animal (ChAT-ChR2-EYFP) que super-expressa o VACHT. Esses animais, apresentam 350%, no hipocampo, e 550%, no tronco encefálico, mais VACHT expresso quando comparado aos controles. Apresentando também uma liberação de acetilcolina de três a quatro vezes maior que os WT (Ren, Qin et al. 2011; Zhao, Ting et al. 2011).

Apesar de exibirem aumento do tônus colinérgico camundongos hipercolinérgicos apresentam comportamento de ansiedade, depressão e locomotor normal. Entretanto, possuem memória motora e espacial prejudicadas, além de déficit de atenção (Kolisnyk, Guzman et al. 2013).

### **3.3 Vasopressina**

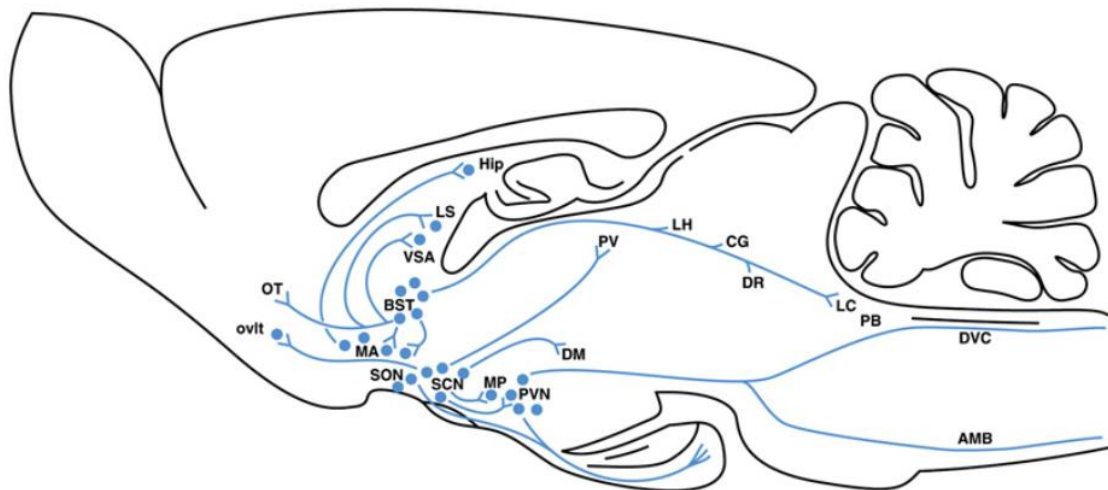
A vasopressina (AVP) ou hormônio anti-diurético (ADH) é um peptídeo de nove aminoácidos (nonapeptídeo) presente em praticamente todos os filos animais. Ela e a OT surgem como um peptídeo único nos invertebrados, posteriormente sofrendo uma duplicação nos peixes ciclóstomos e outros vertebrados, dando origem a dois peptídeos separados. A AVP é sintetizada a partir de uma glicoproteína, no corpo do neurônio, posteriormente sendo acoplada a uma proteína carreadora, a neurofisina. Tanto a vasopressina como a neurofisina são estocadas em vesículas granulares secretórias, o processamento do pró-hormônio é feito por enzimas contidas nessas vesículas, durante o transporte para o terminal axonal. Em resposta ao influxo de  $Ca^{+2}$  a vasopressina é liberada por todo o neurônio (dendritos, terminal axonal, varicosidades axonais e soma). A meia vida desse hormônio é curta, aproximadamente 20min, sua degradação é realizada por aminopeptidases

(Stoop 2012). Classicamente, a AVP é vista como um regulador da homeostase, sendo importante para a termoregulação (Jasnic, Djordjevic et al. 2013), a resposta ao estresse (Jasnic, Djordjevic et al. 2013), a vasoconstrição e a regulação da pressão arterial (Koshimizu, Nakamura et al. 2012), o ritmo circadiano (Cormier, Della-Maggiore et al. 2015) e o equilíbrio hidroeletrólítico (Koshimizu, Nakamura et al. 2012).

A vasopressina é produzida em neurônios magnocelulares e parvocelulares, principalmente em dois núcleos hipotalâmicos, o núcleo paraventricular (PVN) e o supra-óptico (SON). Sendo que o último é o principal responsável por suas funções periféricas devido sua projeção para a neurohipófise, enquanto o primeiro projeta tanto para neuro e adenohipófise quanto para outras regiões do SNC. Embora esses núcleos sejam os maiores produtores de AVP, ela também é sintetizada por neurônios parvocelulares, em sistemas intrínsecos como o BNST, MeA, hipotálamo dorsomedial (DMH), locus coeruleus (LC), núcleos acessórios (AC) (núcleos localizados entre PVN e SON) e no bulbo olfatório (em ratos) (Caldwell, Lee et al. 2008; Tobin, Hashimoto et al. 2010; Koshimizu, Nakamura et al. 2012; Stoop 2012) (Figura 5).

As fibras vasopressinérgicas são encontradas em praticamente todo o sistema nervoso central, sendo abundantes no MOS, no EC, na MA, no VMH, no BNST, no LS, no Hip, na amígdala central (CeA), no DMH, no núcleo do trato solitário, no núcleo prabraquial, no núcleo ambíguo, nas ilhas de Calleja e na medula espinhal (Stoop 2012) (Figura 5). A AVP pode atuar principalmente via três receptores acoplados a proteína G, o V2, V1a e V1b, sendo apenas os receptores do tipo V1 expressos no SNC. Classicamente, os receptores V1 são acoplados a proteína G<sub>q</sub>, sendo que a ligação com seus agonistas gera a

ativação da fosfolipase C (PLC) e essa atua hidrolisando o fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em diacil glicerol (DAG) e inositol (3,4,5)-trifosfato (IP<sub>3</sub>). Esses eventos culminam no aumento do Ca<sup>+2</sup> intracelular e na ativação da proteína cinase C (PKC) (Birnbaumer 2000; Stoop 2012).



**Figura 5 Sistema Vasopressinérgico.** Os círculos azuis representam corpos de neurônios vasopressinérgicos enquanto as linhas representam projeções. Núcleo paraventricular (PVN), Núcleo supra-óptico (SON), Núcleo supra-quiasmático (SCN), núcleo periventricular do hipotálamo (PV), área pré-óptica medial (MP), hipotálamo dorsomedial (DM), amígdala medial (MA), núcleo do leite da estria terminal (BST), hipocampo (Hip), área septal lateral (LS), área septal ventral (VSA), tubérculo olfatório (OT), órgão vasculoso da lâmina terminal (ovlt), núcleo lateral habenuar, substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo (CG), núcleo dorsal da rafe, locus coeruleus (LC), núcleo prabraquial (PB), núcleo ambíguo (AMB) e complexo vagal dorsal (DVC). Adaptado de Koob (2012).

### 3.3.1 Vasopressina e Comportamento Social

A vasopressina e seus receptores são expressos por toda a via neural que controla comportamentos sociais (Albers 2012). Receptores do tipo V1a são encontrados no sistema olfativo, no LS, no hipocampo, no BNST, na CeA, VMH, na HAA, na MeA e na VTA. Por outro lado, os receptores V1b são encontrados de forma ubíqua apenas no CA2 hipocampal, mas também estão presentes no SCN, no PVN e na amígdala (Caldwell, Lee et al. 2008; Stoop 2012).

A AVP é considerada um dos principais moduladores do comportamento social, uma vez que está presente nos mais diversos filis animais, sobrepõem

sua expressão a via neural de comportamentos sociais participando da gênese destes, sejam eles afiliativos ou agonísticos (Albers 2012).

O sistema vasopressinérgico é reconhecido como sendo essencial para a formação da memória social em roedores (Bielsky, Hu et al. 2005; Tobin, Hashimoto et al. 2010; Shahar-Gold, Gur et al. 2013). Apresenta também um papel proeminente no comportamento afiliativo, como no cuidado parental e na formação de pares. Saguís machos apresentam um comportamento de cuidado parental extremamente elaborado protegendo e alimentando a prole. Esses animais apresentam um aumento da expressão de receptores V1a no PFC após se tornarem pais. Além disso, a expressão desses receptores tem uma correlação negativa com a idade da prole, de modo que quanto mais velho o filhote menor a marcação para V1a (Kozorovitskiy, Hughes et al. 2006).

Outro exemplo de comportamento afiliativo induzido pela vasopressina, é o dos arganazes da pradaria (*Microtus ochrogaster*) e dos pinheiros (*Microtus pinetorum*) espécies monogâmicas, que vivem em tocas com famílias extensas enquanto os arganazes da montanha (*Microtus montanus*) e da campina (*Microtus pennsylvanicus*) são poligâmicos e geralmente vivem sozinhos. Nas espécies monogâmicas a AVP induz acasalamento e formação de pares. Já o antagonista V1a diminui o número de acasalamentos e a formação de pares. Por outro lado, esses mesmos fármacos não apresentam efeito nas espécies poligâmicas. Acredita-se que isso ocorra devido a diferenças na expressão dos AVPRs. Arganazes da montanha apresentam mais V1a no LS enquanto os da pradaria apresentam mais no PV. Experimentos com c-Fos também mostram um aumento da atividade de neurônios V1a no PV após o acasalamento em *Microtus ochrogaster* (Insel 2010).

Apesar de modular comportamentos pro-sociais, não se pode negar que um dos principais comportamentos influenciados pelo sistema vasopressinérgico é o agressivo, uma vez que as alterações nesse sistema estão relacionadas a diversos tipos e modelos de agressividade em diversas espécies de roedores (Comai, Tau et al. 2012; Haller 2013).

Um estudo em ratos mostra que a liberação da AVP no septo lateral esta co-relacionada ao aumento da agressividade e que esse efeito é revertido por um antagonista V1a (Veenema, Beiderbeck et al. 2010). Outros trabalhos mostram uma potenciação da sinapse vasopressinérgica em modelos de agressividade, seja através do aumento da expressão de receptores vasopressinérgicos pós-sinápticos (Albers, Dean et al. 2006) ou da expressão do próprio peptídeo (Veenema, Blume et al. 2006; Qiao, Yan et al. 2014). Além disso, camundongos knockout para os receptores V1b apresentam uma redução do comportamento agressivo, sendo que quando esses receptores são re-expressos, ocorre uma recuperação da agressividade (Wersinger, Ginns et al. 2002; Pagani, Zhao et al. 2015).

### **3.3.2 Vasopressina e Acetilcolina**

Acredita-se que exista uma interação íntima entre os sistemas colinérgico e vasopressinérgico. Sabe-se que o hipotálamo, fonte da AVP, recebe projeções colinérgicas vindas da MPOA. De modo que, essas projeções se dirigem para o núcleo supra-óptico do hipotálamo. Além disso, em resposta a infusão de solução hipertônica, que ativa os neurônios vasopressinérgicos do SON, os neurônios colinérgicos da MPOA aumentam sua atividade (Xu, Torday et al. 2003). Interessantemente, o hipotálamo possui corpos de neurônios colinérgicos localizados na zona perinuclear do SON, esses neurônios apresentam

características eletrofisiológicas muito similares a dos neurônios OT e AVP do SON (Wang, Ennis et al. 2015).

Tratamento i.c.v. com carbacol (agonista colinérgico), em fetos de ovinos, aumenta os níveis plasmáticos de vasopressina no feto. Além disso, há um aumento da expressão de c-Fos no SON e PVN, sendo que no SON essa atividade é atribuída aos neurônios AVP, por meio de dupla marcação (Shi, Mao et al. 2008). Em ratos, o tratamento com nicotina em doses altas (2 mg/Kg) leva a um aumento da expressão de Fos em neurônios vasopressinérgicos no SON e PVN (Mikkelsen, Jacobsen et al. 2012).

Por outro lado, a AVP também estimula a liberação de ACh tanto no hipocampo e estriado de animais (Maegawa, Katsube et al. 1992), onde o efeito pode ser revertido por antagonistas vasopressinérgicos (Wang, Yang et al. 2010), quanto em fatias de hipocampo, onde o efeito também é bloqueado por antagonista V1a (Tanabe, Shishido et al. 1999). Comportamentalmente, a AVP é capaz de recuperar déficits cognitivos induzidos pela escopolamina, antagonista muscarínico, na tarefa de esquiva passiva (Tanabe, Shishido et al. 1999) e no labirinto radial de oito braços (memória espacial) (Fujiwara, Ohgami et al. 1997).

Tendo isso em vista, nesse estudo objetivamos estudar como alterações do tônus colinérgico são capazes de modificar o comportamento social de camundongos, verificando ainda o papel do sistema vasopressinérgico nessas alterações.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel do sistema colinérgico na modulação de comportamentos sociais em camundongos.

### 4.2 Objetivos Específicos

Avaliar em camundongos KD<sup>HET</sup> e WT:

1. O comportamento tipo-agressivo através das tarefas de residente intruso e de competição pela comida;
2. A agressividade reativa (anormal) e controlada;
3. O comportamento sexual através do teste de residente intruso com fêmeas OVX;
4. O comportamento alimentar através do teste de competição pela comida;
5. O comportamento social nas tarefas de preferência pela novidade social e de sociabilidade;
6. O comportamento tipo-dominante de camundongos na tarefa de dominância no tubo;
7. O comportamento do tipo impulsivo na tarefa de supressão da novidade alimentar;
8. A atividade locomotora no campo aberto;
9. O efeito da galantamina (GAL), inibidor de acetilcolinesterase, sobre o comportamento agressivo e atividade locomotora;

10. A ativação de áreas envolvidas com o comportamento agressivo na tarefa de residente intruso através da técnica de imunohistoquímica para expressão de c-Fos;

11. A atividade de neurônios vasopressinérgicos nos núcleos paraventricular, supra-óptico, anterior e lateral do hipotálamo (PVN, SON, LH, AH), no núcleo do leito da estria terminal (BNST) e no septo lateral ventral (LSv), pela técnica de imunohistoquímica.

12. A expressão da vasopressina no BNST, AH, LH, PVN, SON e LSv; através da técnica de imunohistoquímica;

13. O efeito do antagonista de receptores V1a vasopressinérgicos, SR49059, sobre o comportamento agressivo de camundongos KD<sup>HET</sup>;

14. O efeito da vasopressina sobre o comportamento social de camundongos WT;

15. A resposta ao estresse através do peso da glândula adrenal.

Avaliar em camundongos C57BL/6:

1. O efeito do aumento agudo do tônus colinérgico, utilizando a GAL, sobre o comportamento social;

2. O efeito da redução aguda do tônus colinérgico, utilizando o vesamicol (inibidor do VAChT), sobre o comportamento social

Avaliar em camundongos C57BL/6 isolados (IS) e agrupados (AG) por 3 semanas:

1. O comportamento agressivo através da tarefa de residente intruso;

2. O efeito da galantamina sobre a agressividade induzida pelo isolamento social na tarefa de residente intruso;

3. A expressão de marcadores colinérgicos (VACht, CHT1 e ChAT), no hipotálamo, através da técnica de western blot;

4. Os níveis hipotalâmicos de ACh através de ensaio fluorimétrico;

5. A inervação colinérgica no AH, LH, PVN e SON através de imunofluorescência;

Avaliar em camundongos ChAT-ChR2-EYFP e WT:

1. O comportamento afiliativo na tarefa de residente intruso;

2. O comportamento social nas tarefas de preferência pela novidade social e de sociabilidade;

3. A atividade locomotora através do campo aberto;

4. O efeito de diferentes durações de isolamento social em induzir a agressividade, através da tarefa de residente intruso.

## 5 JUSTIFICATIVA

A agressividade é um tipo de comportamento conservado evolutivamente, provavelmente devido a sua importância para a sobrevivência do organismo já que é indispensável para a aquisição e manutenção de recursos como território e alimento, além de ter um papel no sucesso reprodutivo. Formas de comportamento agressivo exacerbado estão envolvidas com diversas psicopatologias como transtorno de estresse pós-traumático, depressão, agressividade irritável, transtorno explosivo intermitente, esquizofrenia, doença de Alzheimer e autismo. Apesar disso, ainda existem poucas opções de tratamento para a agressividade, sendo que muitas dessas permanecem sendo ineficazes. Outro aspecto relevante é que existe um grande interesse em intervenções farmacológicas que possam diminuir o comportamento agressivo em humanos tanto devido a transtornos psiquiátricos como ao aumento generalizado da violência em nossa sociedade (Nelson e Trainor, 2007). Além disso, pouco ainda se sabe sobre o papel do sistema colinérgico modulando esse tipo de comportamento. Tendo isso em vista, este estudo teve como objetivo produzir conhecimento básico sobre os efeitos da modulação colinérgica de comportamentos agressivos e afiliativos, utilizando ferramentas farmacológicas e animais geneticamente modificados. Os resultados gerados são relevantes para o estudo da neuroquímica da agressividade, visto que vários peptídeos envolvidos com a agressividade, como a vasopressina, ocitocina e dopamina, tem sua secreção modulada pelo sistema colinérgico.

## **6 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **6.1 Animais Experimentais**

Foram utilizados camundongos machos selvagens (WT) e knockdown VChT heterozigotos (KD<sup>HET</sup>), C57BL/6 e ChAT-ChR2-EYFP, com três a quatro meses de idade. Todos os animais geneticamente modificados tiveram como *background* genético animais C57BL/6J. Os animais foram mantidos em gaiola padrão (30x20x13cm), com no máximo cinco animais por caixa, dentro de uma estante ventilada com temperatura e umidade controladas, com ciclo claro-escuro de 12/12 horas. Não houve restrição de água, a comida foi restrita apenas no teste de competição pela comida e de supressão da novidade pela comida. Visando induzir agressividade os animais C57BL/6 e ChAT-ChR2-EYFP foram isolados por 3 semanas. Esses animais foram alocados no biotério de experimentação de camundongos do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB, UFMG (NB1). Todos os protocolos utilizados neste projeto foram certificados pelo CEUA/UFMG (125/2013; 176/2014).

### **6.2 Testes Comportamentais**

Todas as tarefas comportamentais foram realizadas durante a fase clara do ciclo. Antes de cada tarefa, os animais foram habituados aproximadamente por duas horas à sala de comportamento onde os testes foram realizados.

#### **6.2.1 Teste de Residente Intruso**

Para este teste os animais foram previamente alojados individualmente em uma caixa (30x20x13cm) pelo período de uma a duas horas, visando estimular a territorialidade. Após, um camundongo não-familiar (intruso) foi colocado para interagir livremente, sem restrições, com o camundongo teste por

10 minutos. Todos os intrusos utilizados foram camundongos WT ou C57BL/6 mantidos agrupados, sem experiências de luta significativa. Durante o teste, foram aferidos comportamentos exploratórios (escavação); sociais não-agressivos (tempo gasto explorando e seguindo o intruso) e agressivos (latência para o primeiro ataque, número de ataques, tempo de ataque, serpenteado de cauda e comportamento agonístico, este consiste na somatória de tempo de todos os comportamentos envolvidos no conflito, como o serpenteado de cauda, o comportamento de perseguição, posturas ofensivas e ataques). Para a avaliação da agressividade reativa (anormal) foi utilizado o mesmo paradigma experimental, porém uma fêmea SWISS ovariectomizada (OVX) e um animal anestesiado foram utilizados como intrusos. No caso da fêmea foi medido também comportamento sexual (tempo total de interação sexual), número de montas e latência para a primeira monta (Beiderbeck, Reber et al. 2012).

### **6.2.2 Teste de Competição pela Comida (FCT)**

Nesse teste, os animais foram habituados a flocos de chocolate (Nescau cereal, Nestle) três dias antes da realização do teste e durante esse período, receberam apenas 20g de ração e 7g de flocos de chocolate. Após, cada animal foi habituado por 20 minutos à caixa (30x20x13cm) e submetidos a 12 horas de jejum antes do teste. O teste consistiu em colocar três flocos de chocolate no centro da caixa, onde os animais foram habituados. Ambos o animal experimental e o intruso foram soltos simultaneamente nesta caixa. Medimos comportamentos alimentares, como a latência para o início da alimentação, o tempo gasto na alimentação e o número de flocos consumidos; além de comportamentos agressivos como tempo de ataque, número de ataques, latência para o primeiro ataque, serpenteado de cauda, comportamento

agressivo total; e comportamento social não-agressivo. Vale ressaltar que tanto animais experimentais quanto os intrusos passaram por todas as etapas da habituação (Cordero and Sandi 2007).

### **6.2.3 Teste de Sociabilidade e Preferência pela Novidade Social**

O teste consiste em três sessões, cada uma com duração de 10 minutos. Na primeira, o camundongo foi colocado em uma caixa de acrílico 50 x 50 x 60 cm (Accuscan Instruments) para o período de habituação. Na segunda sessão, foram colocados dois cilindros de acrílico (10 cm de diâmetro), cada um com 60 orifícios igualmente distribuídos e equidistantes, na caixa. Um dos cilindros continha um animal (intruso) que serviu de estímulo social e o outro cilindro permaneceu vazio, correspondendo a um estímulo não social (objeto). Foi aferido o tempo que o animal experimental passou explorando o objeto e o co-específico (sociabilidade). Posteriormente, na terceira sessão, um novo intruso foi colocado no cilindro que estava vazio, então medimos o tempo que o animal experimental explorou o novo intruso e o antigo intruso (preferência pela novidade social). Animais geralmente preferem o intruso ao objeto e a novidade social à familiaridade (Nadler, Moy et al. 2004).

### **6.2.4 Teste de Dominância no Tubo**

Durante o teste, os animais experimentais foram confrontados com um intruso (WT selecionado para o fenótipo dominante ou submisso). Cada um dos animais foi colocado na extremidade oposta de um tubo de P.V.C. (3cm de diâmetro e 30 cm de comprimento) e ambos soltos simultaneamente. Este confronto foi repetido 12 vezes e o número de vezes que cada animal saiu completamente do tubo foi contabilizado. Os animais que saíram mais vezes foram considerados derrotados, enquanto os que permaneceram no tubo foram

considerados vencedores. Se nenhum dos animais se retirasse do tubo por dois minutos, a sessão não era contabilizada. Vale salientar que foram utilizados animais com peso e idade semelhantes (You, Jung et al. 2012).

### **6.2.5 Teste de Supressão da Novidade pela Comida (NSF)**

Os animais foram privados por 16 horas de alimento antes do teste. Durante o teste os animais foram soltos na periferia de uma caixa de acrílico do tipo campo aberto (50 x 50 x 60 cm, Accuscan Instruments), onde previamente, no centro da arena, foi colocado um pellet de ração. O teste dura cinco minutos sendo contabilizados o tempo gasto na alimentação e a latência para encontrar o pellet. O centro da caixa é um local onde o animal se encontra exposto, portanto o teste consiste num conflito do animal entre se expor ou saciar sua fome. Quanto menor a latência para encontrar e se alimentar do pellet, mais impulsivo é considerado o animal (You, Jung et al. 2012).

### **6.2.6 Atividade Locomotora**

A atividade locomotora espontânea foi acessada utilizando o aparelho de campo aberto automático (LE 8811 IR Motor Activity Monitors PANLAB, Harvard Apparatus; Spain), com dimensões de 450 x 450 x 200 mm. O aparelho possui sensores de infravermelho que captam tanto a distância percorrida em centímetros quanto o deslocamento vertical do animal (rearing). Os animais foram testados nesse aparato por 5 minutos. Posteriormente a atividade locomotora foi avaliada utilizando o programa ACTITRACK (Guimaraes, Carvalho et al. 2015).

### **6.3 Drogas**

A galantamina, inibidor da acetilcolinesterase, foi solubilizado em salina e administrado na dose de 0,1 mg/Kg por via intraperitoneal (i.p.) 30 minutos antes do teste RI e atividade locomotora (Ago, Koda et al. 2011). O SR49059, antagonista do receptor V1a, foi solubilizado em 20% dimetil sulfóxido (DMSO) e administrado no núcleo do leito da estria terminal (BNST) na dose de 20 ng/ $\mu$ l, 0,5  $\mu$ l, 10 minutos antes do RI (Veenema, Beiderbeck et al. 2010). O vesamicol, inibidor do VAcHT, foi solubilizado em 20% DMSO e administrado via intracerebroventricular (i.c.v.) nas concentrações de 5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M, 20 minutos antes do RI, 2,5  $\mu$ l (Searl, Prior et al. 1991; Rodrigues, Fonseca Mde et al. 2013).

### **6.4 Imunohistoquímica**

Animais foram anestesiados com solução de quetamina (80mg/kg) e xilazina (15mg/kg) via i.p. e então submetidos à perfusão intracardíaca com 10ml de tampão fosfato (PBS 0.1M) seguido de 10ml de paraformaldeído (PFA) 4%. Os cérebros foram removidos e fixados em PFA 4% por 24 horas a 4°C. No dia seguinte, os cérebros foram transferidos para uma solução de sacarose a 30% por 72 horas. As secções coronais de 40 $\mu$ m do cérebro foram obtidas através de um criostato. Após sua obtenção, as fatias foram armazenadas a -20°C em solução crioprotetora (sacarose 30%) até que pudessem ser utilizadas no ensaio de imunohistoquímica.

Foram escolhidas seis fatias para todos os protocolos de imunohistoquímica realizados. Para o hipotálamo foram escolhidas fatias contidas entre a -0,58 e -1,22 mm com relação ao Bregma, correspondente à extensão dos núcleos avaliados. A cada fatia selecionada eram descartadas duas fatias para evitar sobreposição entre os cortes. Para regiões extra-

hipotalâmicas as secções foram escolhidas entre 0,62 e -0,1 com relação ao Bregma, correspondente a extensão dos núcleos avaliados. Novamente a cada fatia selecionada foram descartadas duas fatias.

O protocolo de imunohistoquímica consistiu na exposição das fatias aos seguintes passos: três lavagens de 5 minutos em TBS 0,1 M seguidas de uma incubação em peróxido de hidrogênio 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 10 minutos e mais três lavagens em TBS por 5 minutos. Após, as fatias foram incubadas por 2h em solução de bloqueio contendo 3% de soro de cabra (NGS) em TBST. Em seguida, foram incubadas com anticorpo primário (anti-Fos 1:2000, Santa Cruz Biotechnology, INC ) overnight a temperatura ambiente. No dia seguinte, as fatias foram submetidas a três lavagens de 5min em TBST. Logo após, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado (anti-coelho 1:1000; Santa Cruz Biotechnology) em solução NGS+TBST. Subsequentemente, foram realizadas três lavagens de 5min cada, em TBST, seguida de 1h de incubação no complexo avidina-biotina (Kit ABC Elite – Vectastain) em TBST. Posteriormente, as fatias foram lavadas por três vezes de 5min cada, em TBS 0,1M e por três vezes de 5min cada, em tampão acetato. Finalmente, os cortes foram incubados em solução de coloração contendo o cromógeno 3,3' diaminobenzidina-HCl (DAB), solução de sulfato de níquel, tampão acetato e peróxido de hidrogênio (3%) por 10min. Posteriormente as fatias passaram por três lavagens de 5min em tampão acetato. Os passos citados acima foram seguidos para a marcação simples para a proteína Fos. Em seguida, as fatias passaram por três lavagens de 5 min em TBS. A fim de realizar a dupla marcação os mesmos cortes passaram pelos mesmos passos citados anteriormente entretanto utilizando anticorpo primário (anti-vasopressina 1:1000, PS41 doado

pelo Dr. Harold Gainer) e anticorpo secundário anti-mouse (anti-camundongo, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology).

As fatias coradas foram distribuídas em lâminas gelatinizadas e após secagem fixadas em xilol e cobertas com lamínulas utilizando entellan.

As imagens foram quantificadas com a ajuda do programa ImageJ Fiji (Versão 1.44p, National Institute Health, USA). A área analisada foi demarcada manualmente. Logo em seguida, foi realizada a contagem do número total de células c-Fos e AVP positivas. Além disso, foi feito um cálculo do número de células co-localizadas c-Fos-AVP dividido pelo número total de neurônios vasopressinérgicos amostrados, a fim de se obter o número de neurônios ativos naquela população (Taxa de neurônios vasopressinérgicos ativos). Foi realizada também a comparação entre as áreas delineadas para a contagem.

## **6.5 Western Blot**

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o hipotálamo foi retirado e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até utilização. As amostras foram então homogeneizadas em tampão de RIPA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM (pH=7.4), EDTA 1 mM, Nonidet P40 1%, PMSF 1 mM, sódio deoxicolato 0.5%) em banho de gelo. O homogenato foi centrifugado a 2040.35 g (Centrífuga Eppendorf 5415R - Alemanha) a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e a concentração total de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford, utilizando a proteína albumina de soro bovino (BSA) (1mg/ml) como padrão.

As amostras, contendo 50  $\mu\text{g}$  de proteínas totais, foram desnaturadas em tampão de amostra (Tris-HCl 100 mM pH=6.8, SDS 4%, azul de bromofenol 0.2%, glicerol 20%, H<sub>2</sub>O 20%, b-mercaptoetanol 0.5%) a  $100^{\circ}\text{C}$  por 4 minutos, carregadas e separadas no gel de SDS-poliacrilamida (10%) e, então

transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno, PVDF (PVDF, Immobilon-P, Millipore, Massachusetts, USA). Após bloqueio de 24 horas em TBST (tampão Tris com 0,1% de tween 20) contendo de leite 5% sem gordura, as membranas foram incubadas overnight a 4°C com anticorpos primários específicos - GAPDH (1:2500, Abcam Inc, ab9483), ChAT (1:1000, doado pelos professores Marco Prado e Cristina Guatimosin), VACht (1:1000, doado pelos professores Marco Prado e Cristina Guatimosin) ou CHT1 (1:250, doado pelo professor Marco Prado).

Para a visualização quimioluminescente, as membranas foram incubadas em temperatura ambiente, por 2 horas, com anticorpos secundários anti-coelho (1:5000) conjugados com uma peroxidase. As bandas de proteínas foram detectadas utilizando o sistema de detecção Western ECL (Pierce) e a densidade das mesmas foi quantificada pelo software ImageJ (Versão 1.44p, National Institute Health, USA) (Ferreira-Vieira, Bastos et al. 2014).

## **6.6 Imunofluorescência**

Animais foram anestesiados com solução de quetamina (80mg/kg) e xilazina (15mg/kg) via i.p. e então submetidos à perfusão intracardíaca com 10ml de tampão fosfato (PBS 0.1M) seguido de 10ml de paraformaldeído (PFA) a 4%. Os cérebros foram removidos e fixados em PFA 4% por 24 horas a 4°C. No dia seguinte, os cérebros foram transferidos para uma solução de sacarose a 30% por 72 horas. As secções coronais de 40µm do cérebro foram obtidas através de um criostato. Após sua obtenção, as fatias foram armazenadas a -20° em solução crioprotetora até que pudessem ser utilizadas no ensaio de imunofluorescência.

Foram escolhidas seis fatias de cada animal, correspondentes a regiões hipotalâmicas avaliadas, entre -0,58 e -1,22 mm, com relação ao Bregma. A cada fatia selecionada foram descartadas duas fatias para evitar sobreposição entre os cortes.

O protocolo de imunofluorescência consistiu na exposição das fatias aos seguintes passos: três lavagens em PBS por 6 minutos [PB 0.1M (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0.387 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,612 M); pH=7,4; pK=~ 7,21], sendo posteriormente incubadas em tampão glicina (0,1M) por 20 minutos visando diminuir a inespecificidade antígeno-anticorpo, passando em seguida por mais três lavagens de 6 minutos em PBS, seguidas do mesmo tipo de lavagem em PBST. Após, os cortes foram incubados por 1h em solução de bloqueio contendo 5% de soro de cabra (NGS) em PBST. Logo em seguida, as fatias foram incubadas com anticorpo primário (anti-ChAT 1:250; doado pelos professores Marco Antônio Máximo Prado e Cristina Guatimosin) overnight a temperatura ambiente. No dia seguinte, foram submetidas a três lavagens de 6min em PBST. Logo após, as fatias foram incubadas com anticorpo secundário fluorescente, a temperatura ambiente e protegidas da luz (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit (1:400), Molecular Probes®) em solução NGS+PBST. Após 3 lavagens de 6 min em PBS os cortes foram incubados em solução de DAPI (Molecular Probes®) , por 10min. Subseqüentemente, foram realizadas quatro lavagens de 10min cada, em PBS. Finalmente, as fatias coradas foram distribuídas em lâminas (Superfrost® Plus) com gel aquoso de montagem não-fluorescente (Hidromount TM). Para posterior análise, as lâminas montadas foram protegidas da luz e estocadas a 4°C.

Quantificamos as imagens através do programa ImageJ Fiji (Versão 1.44p, National Institute Health, USA). A quantificação foi realizada por densitometria óptica, avaliamos a intensidade de marcação e porcentagem de área marcada. Além disso, foi feita a comparação entre as áreas delineadas para as análises.

### **6.7 Ensaio Fluorimétrico para Detecção de Acetilcolina**

As amostras de hipotálamo foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas à -80°C até que fossem processadas para a dosagem de ACh. A dosagem foi realizada utilizando o kit ab65345 (Abcam), utilizando a colina como marcador indireto da ACh.

Posteriormente as amostras foram homogeneizadas no tampão específico fornecido pelo kit. Logo em seguida, o homogenato foi centrifugado a 2040.35  $g \times$  (Centrífuga Eppendorf 5415R - Alemanha) a 4°C por 15 minutos, visando lisar as células do tecido.

Em seguida, utilizando uma placa de 96 wells negra, foi pipetada uma curva padrão com concentrações crescentes de ACh (0 a 500pmol/well). As amostras foram pipetadas em quadruplicata sendo que cada well recebeu 50 $\mu$ l de amostra. Todas as amostras receberam 50 $\mu$ l do *reaction mix*. Sendo que, metade das amostras recebeu o *reaction mix* contendo probe fluorescente para marcar a colina, tampão fosfato, acetilcolinesterase e o mix enzimático para colina, essas amostras visavam verificar a quantidade de Ch total. Enquanto a outra metade recebeu *reaction mix* com apenas tampão fosfato, probe colina e mix enzimático para colina, visando dosar a Ch livre. A placa foi incubada por 30min em temperatura ambiente protegida da luz. Em seguida, a fluorescência

emitida pelo probe colina foi captada por um leitor de microplaca (Ex/Em = 535/590 nm).

Após a leitura, o valor obtido foi subtraído do branco e em seguida interpolado na curva padrão para calcular a concentração de colina correspondente à fluorescência captada. A concentração de colina foi determinada pela razão entre o volume de amostra usada e a concentração fornecida pela curva padrão. A partir desse valor, foi subtraído o valor da colina total da colina livre, fornecido pelos diferentes mixes, fornecendo então o valor da ACh.

### **Acetilcolina= Colina Total – Colina Livre**

#### **6.8 Cirurgia Estereotáxica**

Os animais experimentais foram anestesiados por via intraperitoneal com quetamina (80mg/kg) e xilazina (15mg/kg). Posteriormente os animais foram fixados ao aparelho estereotáxico. E então foi feita a exposição do crânio, seguindo a retirada do periósteo. O Bregma foi utilizado como referência para a inserção das cânulas (22G) uni ou bilateralmente e de parafusos de sustentação. Nos animais KD<sup>HET</sup> as cânulas foram inseridas bilateralmente no BNST (AP: + 0,2; LL: ± 1,0 DV: 3,9 mm) (Kim, Adhikari et al. 2013). Já nos animais C57BL/6 a cânula foi inserida unilateralmente no ventrículo lateral (AP: + 0,5; LL: ± 1,0 DV: 1,8 mm) (Guimaraes, Carvalho et al. 2015). Após a cirurgia os animais receberam administração de analgésico banamine por via intra-muscular (1mg/kg).

## **6.9 Histologia**

Visando confirmar que a infusão das drogas ocorreu no ventrículo lateral e BNST ao término dos protocolos comportamentais os animais foram eutanasiados e tiveram o cérebro removido e armazenado em paraformaldeído (4%) por 24h e em sacarose (30%) por 72h. Os cérebros foram fatiados em um criostato de mesa em fatias de 100µm perto do orifício deixado pela cânula. As fatias foram coradas com vermelho neutro e o local de injeção foi verificado com auxílio de uma lupa. Apenas os animais com as cânulas localizadas na coordenada alvo foram incluídos nas análises estatísticas.

## **6.10 Estatística**

A análise estatística foi feita por meio do programa Graphpad Prism 5.0. Todos os valores analisados passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, sendo os dados normais analisados via testes paramétricos, com exceção do ensaio fluorimétrico para dosagem de ACh. O teste de residente intruso, supressão da novidade alimentar e atividade locomotora nos KD<sup>HET</sup> foram analisados usando teste t. Os dados provenientes dos testes de residente intruso após a infusão de galantamina, o teste de sociabilidade e preferência pela novidade social e de dominância no tubo foram comparados através da ANOVA de duas vias, utilizando o post-hoc Bonferroni como correção.

Os dados de agressividade reativa (RI+OVX ou RI+Anestesiado) e FCT foram analisados qualitativamente através do teste de Fisher. Para avaliar comportamentos sexual e alimentar utilizamos teste t.

A imunohistoquímica para AVP e c-Fos foi avaliada utilizando a ANOVA de duas vias, com post-hoc Bonferroni como correção. A imunofluorescência e

a infusão de drogas no cérebro foram avaliadas por meio do teste t. Enquanto, o ensaio fluorimétrico para ACh, foi avaliado pelo teste de Mean-Whitney .

## **6.11 Delineamento Experimental**

### **6.11.1 Efeito da hipofunção colinérgica sobre o comportamento agressivo, locomotor e resposta ao estresse**

Inicialmente, animais WT (n=11) e KD<sup>HET</sup> (n=13), foram pesados, posteriormente passaram pelo teste de RI. Logo em seguida os mesmos animais foram utilizados para análise da atividade locomotora. Finalmente após os testes comportamentais esses animais foram eutanasiados por deslocamento cervical os cérebros e as adrenais foram removidos, sendo o peso destas aferido e relativizado pelo peso do animal.

### **6.11.2 Efeito da hipofunção colinérgica sobre a sociabilidade, dominância e impulsividade de camundongos**

Esse protocolo experimental foi realizado em 6 dias, utilizando animais WT (n=5) e KD<sup>HET</sup> (n=5), entre cada tarefa comportamental os animais tiveram um dia de descanso. O primeiro teste comportamental foi o teste de sociabilidade e preferência pela novidade social, tarefa com menor componente aversivo. No dia seguinte os mesmos animais passaram pela tarefa de dominância no tubo, após um dia de descanso, os mesmos animais passaram pela privação alimentar por 16 horas e posteriormente pela tarefa de supressão da novidade pela comida, após as tarefas comportamentais os animais foram eutanasiados e os cérebros foram removidos.

### **6.11.3 Efeito da hipofunção colinérgica sobre a agressividade reativa e controlada de camundongos**

Esse delineamento experimental foi realizado em 9 dias, utilizando camundongos WT (n=6) e  $KD^{HET}$  (n=5), entre cada tarefa comportamental foi dado um intervalo de 2 dias para que os animais descansassem e para evitar aumento do comportamento agressivo em decorrência de repetir a tarefa comportamental. Inicialmente, os animais passaram pelo FCT, sendo habituados ao chocolate nos 3 primeiros dias, no terceiro dia foram habituados a caixa onde ocorreu o teste (quarto dia). Após 2 dias os mesmos animais passaram pelo RI, onde foram confrontados com uma fêmea ovariectomizada, e posteriormente com os intrusos anestesiados. Ao fim dos experimentos comportamentais os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus cérebros foram removidos.

### **6.11.4 Efeito da galantamina sobre o comportamento agressivo e atividade locomotora de camundongos com hipofunção colinérgica**

Nesse delineamento experimental utilizamos animais WT SAL (n=5), WT GAL (n=8),  $KD^{HET}$  SAL (n=6) e  $KD^{HET}$  GAL (n=6), Inicialmente, todos os animais foram administrados com galantamina ou salina i.p., 30 minutos antes do teste de residente intruso. Após os 10min de teste apenas os animais heterozigotos passaram pelo teste de atividade locomotora. Após a tarefa comportamental os animais foram eutanasiados.

#### **6.11.5 Efeito da hipofunção colinérgica sobre a atividade neural, ativação de neurônios vasopressinérgicos e expressão de vasopressina**

Nesse protocolo foram utilizados animais WT Naïve (n=5), WT Tarefa (n=6) KD<sup>HET</sup> Naïve (n=6) e KD<sup>HET</sup> Tarefa (n=7). Inicialmente o grupo tarefa passou pelo teste de residente intruso 1:30 após o teste os animais foram anestesiados e perfundidos. O grupo naïve não passou pelo RI, ou seja, permaneceu na caixa. Estes animais foram perfundidos após as perfusões dos animais tarefas.

#### **6.11.6 Efeito do SR49059 sobre o comportamento agressivo de camundongos KD<sup>HET</sup>**

Nesse experimento os animais KD<sup>HET</sup> passaram pela cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas bilaterais. Após 3 dias de recuperação esses animais foram infundidos com a droga SR49059 (n=8) ou veículo (n=5), 10min antes da tarefa de RI. Após a tarefa, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os cérebros foram removidos para confirmação histológica das cânulas.

#### **6.11.7 Efeito agudo da redução do tônus colinérgico sobre o comportamento social de camundongos**

Nesse experimento os animais C57BL6/J passaram pela cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas unilaterais. Após 3 dias de recuperação esses animais foram infundidos com a droga vesamicol 10µM (n=8), 5µM (n=4) ou veículo (n=6), 20min antes da tarefa de RI. Após a tarefa, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os cérebros foram removidos para confirmação histológica das cânulas.

#### **6.11.8 Efeito da hiperfunção colinérgica sobre o comportamento social e atividade locomotora de camundongos**

Esse delineamento teve duração de 3 dias, utilizamos camundongos WT (n=10) e ChAT-ChR2-EYFP (n=10). Inicialmente os animais passaram pelo teste de RI, logo em seguida foi avaliada a atividade locomotora. Após um dia de descanso os mesmos animais passaram pela tarefa de sociabilidade e preferência pela novidade social. Após as tarefas comportamentais esses animais foram anestesiados e perfundidos os cérebros foram removidos e armazenados em solução fixadora para posterior análises histoquímicas.

#### **6.11.9 Efeito do aumento agudo do tônus colinérgico sobre o comportamento social de camundongos**

Nesse delineamento experimental utilizamos animais C57BL6/J administrados com galantamina (n= 6) ou salina (n=5) i.p., 30 minutos antes do teste de residente intruso. Em seguida ao teste, os animais passaram pelo teste para avaliar atividade locomotora. Depois de um dia de descanso os mesmos animais foram invertidos recebendo galantamina e veículo e testados no teste de sociabilidade e preferência pela novidade social. Após a tarefa comportamental os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

#### **6.11.10 Efeito da galantamina sobre o comportamento agressivo de camundongos isolados**

Visando induzir o comportamento agressivo camundongos C57BL6/J foram isolados por 3 semanas. Após esse período, os animais receberam infusão de GAL i.p. ou veículo 30min antes do teste de RI, os grupos experimentais foram AG SAL (n=11), AG GAL (n=12), IS SAL (n=10) e IS GAL (n=10). Em seguida ao teste a atividade locomotora dos animais foi aferida. Depois das tarefas, os

animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. O cérebro dos veículos foi removido e os hipotálamos dissecados para análises de western blot dos marcadores colinérgicos ChAT, VAcHT e CHT.

#### **6.11.11 Efeito do isolamento social sobre a expressão de ChAT e os níveis de ACh hipotalâmicos**

A fim de induzir o comportamento agressivo animais C57BL6/J foram isolados por 3 semanas AG (n=9) e IS (n=10). Após esse período, os animais foram divididos em dois grupos imunofluorescência AG (n=5) e IS (n=6) e dosagem de ACh AG (n=4) e IS (n=4). Para o protocolo de imunofluorescência os animais foram anestesiados, perfundidos transcárdicamente e os cérebros foram removidos e fixados, no último dia de isolamento. Para a dosagem de ACh os animais foram eutanasiados por deslocamento vertical e os cérebros foram dissecados e os hipotálamos removidos e congelados para a dosagem.

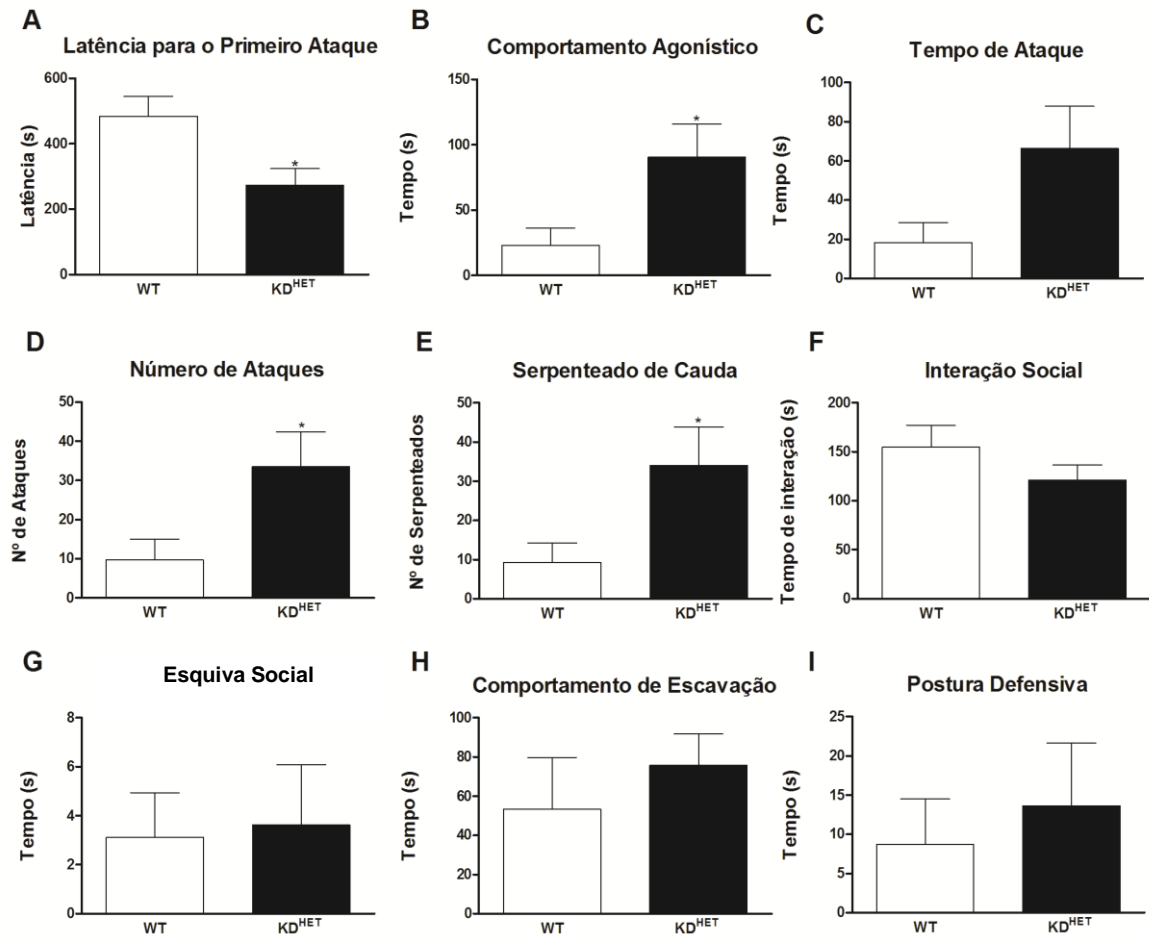
#### **6.11.12 Efeito da hiperfunção colinérgica em bloquear o aumento do comportamento agressivo induzido pelo isolamento social**

Animais WT, AG (n=3) e IS (n=4), e ChAT-ChR2-EYFP, AG (n=3) e IS (n=4), foram isolados por 3 semanas. O comportamento agressivo foi medido por meio do teste de RI com 1, 2 e 3 semanas de isolamento. Após o último teste comportamental os animais foram anestesiados, perfundidos transcárdicamente e o cérebro foi removido e armazenado em solução fixadora.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Animais com hipofunção colinérgica apresentam comportamento agressivo exacerbado

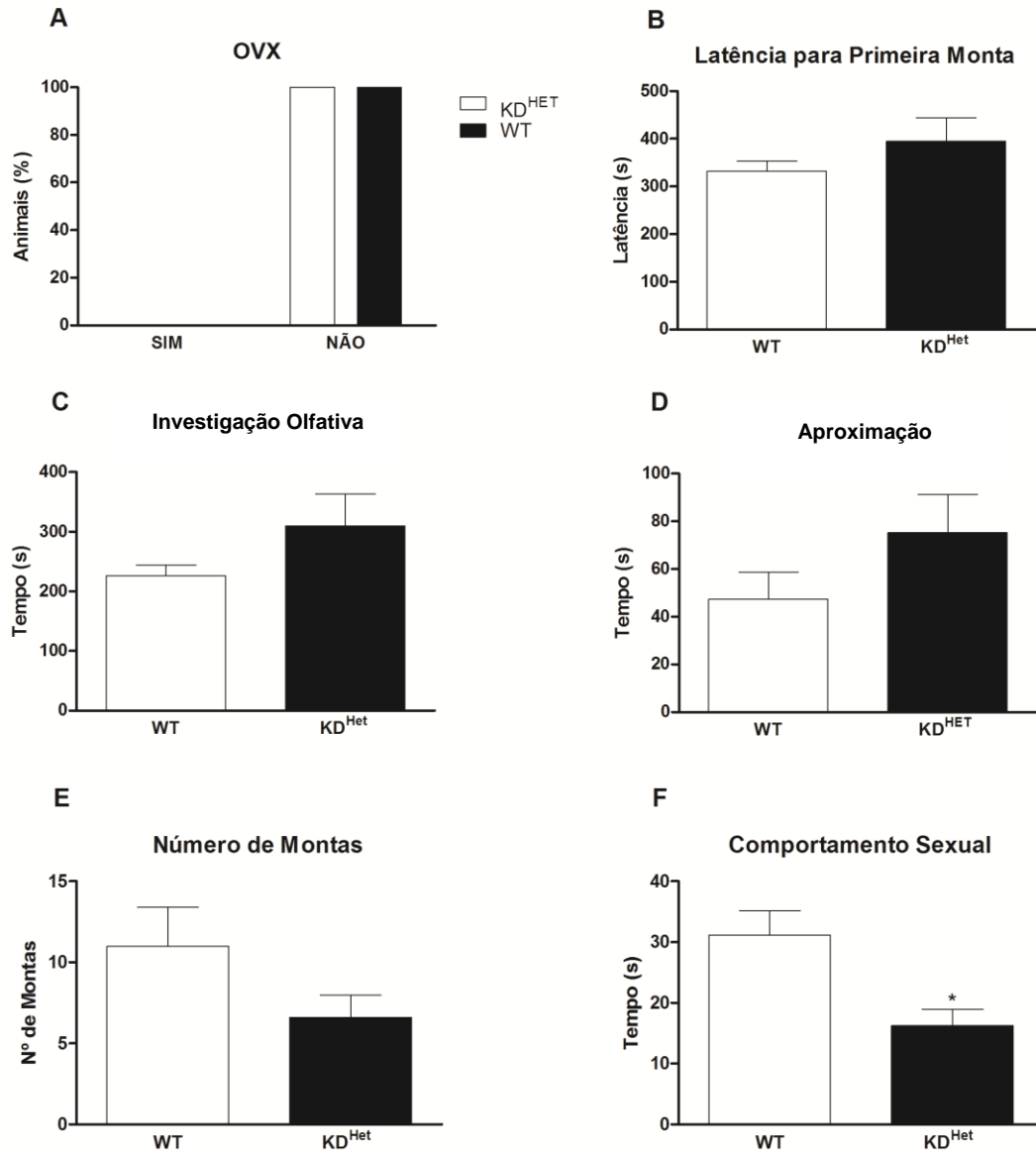
Animais  $KD^{HET}$  apresentam comportamento agressivo quando comparados aos animais WT no teste de RI (Figura 6). Camundongos  $KD^{HET}$  apresentam menor latência para o primeiro ataque ( $t_{(7)}= 1,586$ ,  $p=0,0192$ ), maior tempo em comportamento agonístico ( $t_{(7)}= 3,357$ ,  $p=0,0405$ ), maior número de ataques ( $t_{(7)}= 2,462$ ,  $p=0,0325$ ) e de serpenteados de cauda ( $t_{(7)}= 3,498$ ,  $p=0,05$ ). Houve também uma tendência para um maior tempo de ataque ( $t_{(7)}= 3,947$ ,  $p=0,074$ ). Nenhuma alteração foi vista em outros comportamentos defensivos, exploratórios (escavação) e de interação social não-agressiva.



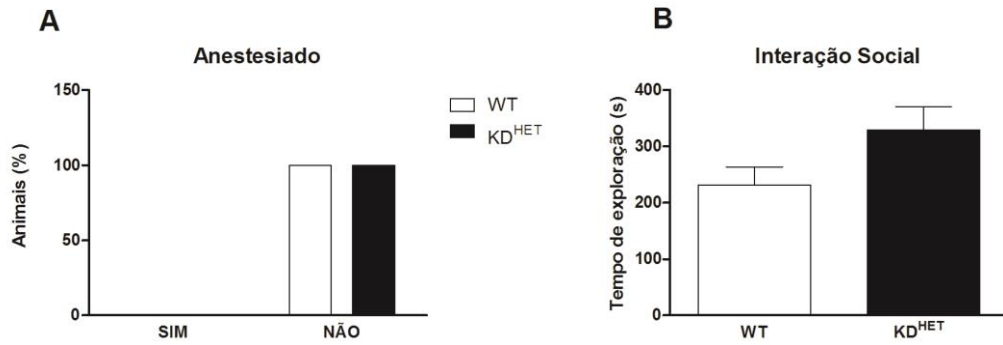
**Figura 6** Teste de Residente Intruso em VAcHt KD. Latência para o primeiro ataque (A); Tempo de Comportamento Agonístico (B); Tempo de Ataque (C); Número de Ataques (D); Número de Serpenteados de Cauda (E); tempo de interação social (F); Avoidance (G); Comportamento de Escavação (H) e c Postura Defensiva (I). Resultados obtidos com camundongos KD<sup>HET</sup> n= 9 WT n=10. Barras representam a média ± o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica p < 0,05. Teste t.

## 7.2 Animais com hipofunção colinérgica apresentam agressividade instrumental mas não anormal

Camundongos KD<sup>HET</sup> não apresentam comportamento agressivo quando confrontados com intrusos que não são ameaças como uma fêmea OVX (Figura 7) ou um animal anestesiado (Figura 8). Entretanto, apresentam menor tempo de comportamento sexual com a fêmea ( $t_{(4)} = 2,434$ ,  $p = 0,0154$ ) (Figura 7F).

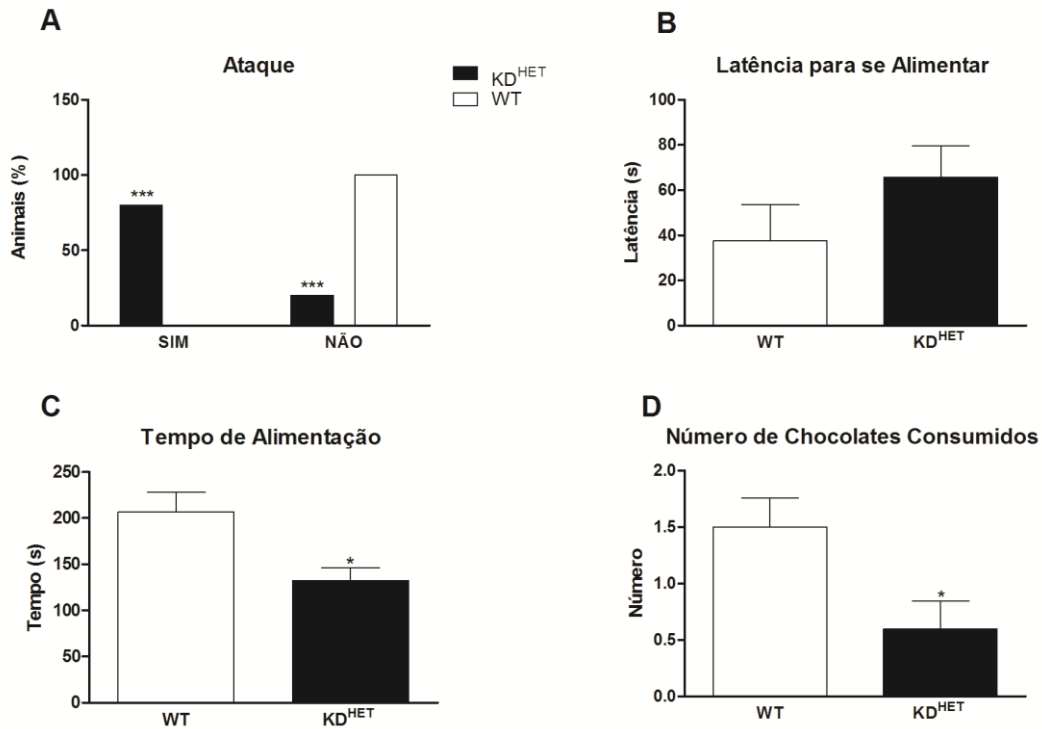


**Figura 7** Teste de residente intruso, confronto com uma fêmea SWISS OVX. Porcentagem de animais que atacaram a OVX (A); Latência para a Primeira Monta (B); Sniffing (C); Following (D); Número de Montas (E); Comportamento Sexual (F); Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ . Resultados obtidos com camundongos KD<sup>HET</sup> n=5 e WT n=6. Teste t e Teste de Fisher.



**Figura 8** Teste de Residente Intruso, confronto com um animal anestesiado. Porcentagem de animais que atacaram o intruso anestesiado (A); Tempo de exploração no animal anestesiado (B. Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). Resultados obtidos com camundongos KD<sup>HET</sup> n=5 e WT n=6

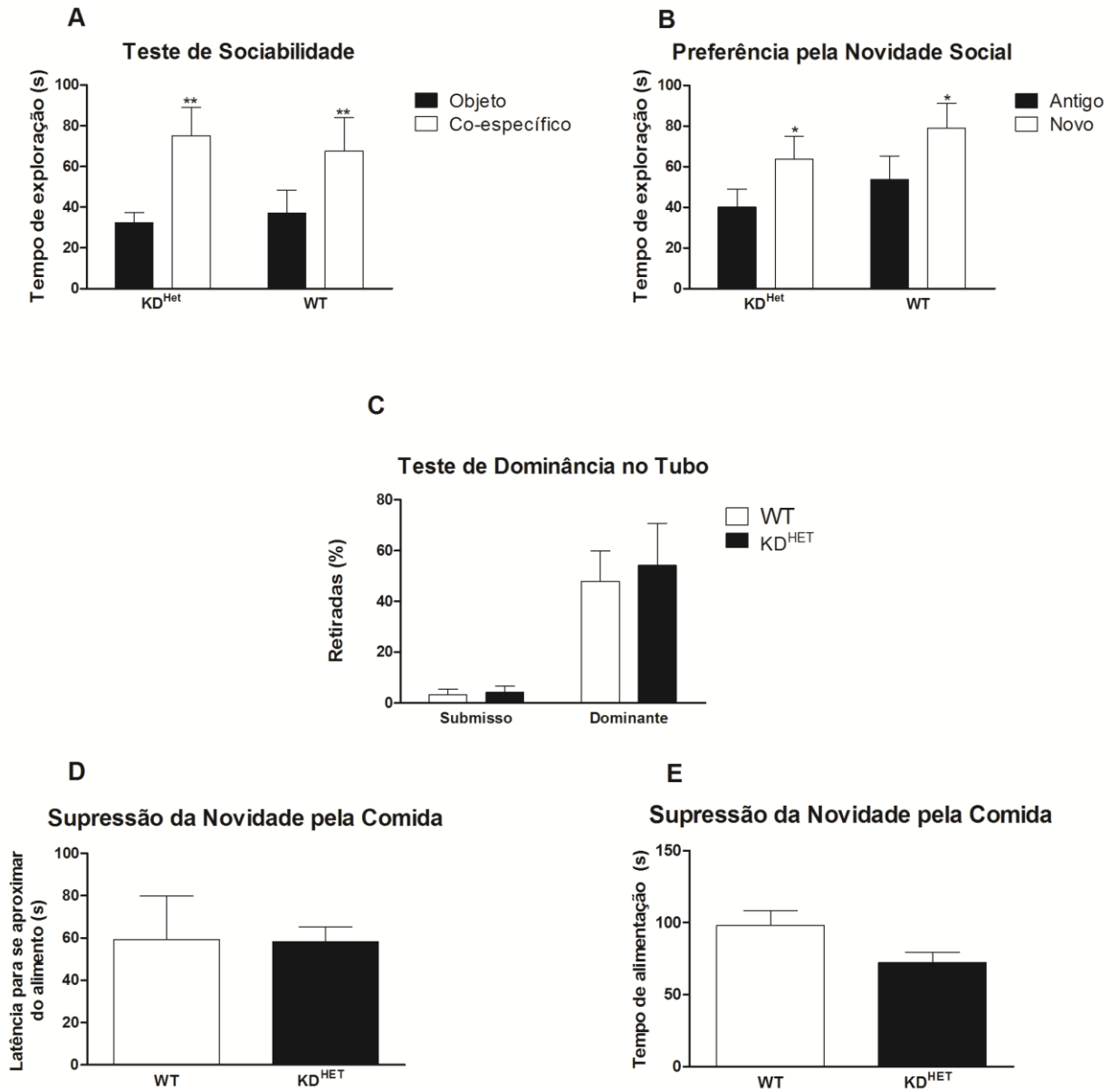
Já em uma tarefa onde a agressividade é estímulo dependente (FCT), 80% dos heterozigotos atacam contra nenhum dos animais selvagens ( $p < 0,0001$ ) (Figura 9A). Além disso, os animais mutantes apresentaram uma redução do comportamento alimentar (Figura 9C e 9D), visto pelo tempo de alimentação ( $t_{(4)} = 2,313$ ,  $p = 0,0205$ ) e pelo número de bolas de chocolate consumidas ( $t_{(4)} = 1,333$ ,  $p = 0,0343$ ) durante o teste. Não houve diferença entre os genótipos quanto à latência para encontrar o chocolate.



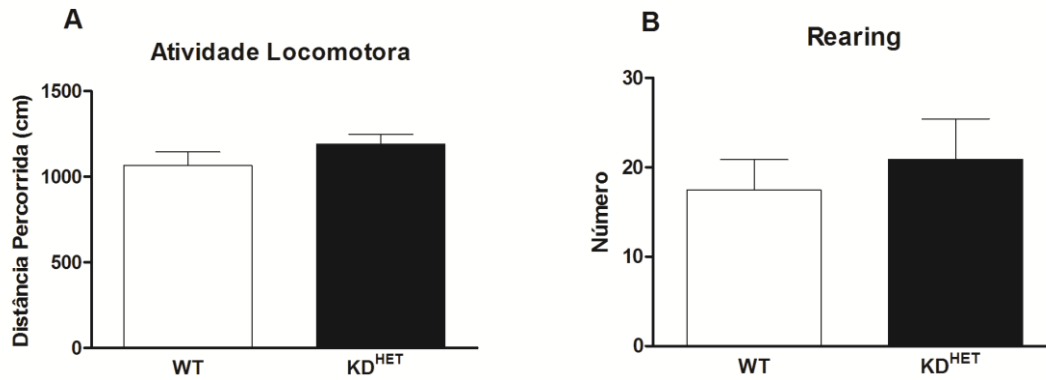
**Figura 9** Teste de Competição pela Comida (FCT). Porcentagem de animais que atacaram no FCT (A); latência para encontrar o chocolate (B); tempo de alimentação (C); ingestão alimentar (D). Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ ; \*\*\* indica  $p < 0,001$ . Resultados obtidos com camundongos KD<sup>HET</sup> n=5 e WT n=6

### 7.3 Animais com hipofunção colinérgica não apresentam alterações no comportamento de sociabilidade, dominância, impulsividade ou locomoção

Como observado na figura 10, a redução do tônus colinérgico em animais heterozigotos não apresenta efeito no comportamento de sociabilidade, os dois genótipos preferem o estímulo social e a novidade ao estímulo inanimado e a familiaridade, respectivamente. Quanto à dominância, ambos saem mais do tubo na presença de um animal dominante e menos na presença de um submisso. A impulsividade também não foi alterada pelo tônus colinérgico, sendo que não houve diferença na latência para encontrar a ração. Quanto à locomoção, não houve diferença na distância percorrida e no deslocamento vertical (rearing) entre os genótipos (Figura 11).



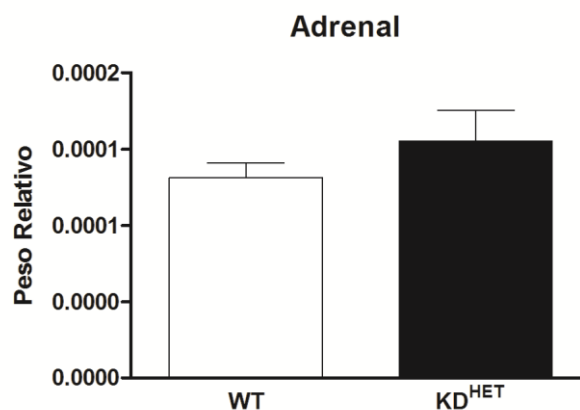
**Figura 10** Sociabilidade, Dominância e Impulsividade em KD<sup>HET</sup>. Sociabilidade (A); Preferência pela Novidade Social (B); Teste de Dominância no Tubo (C); Latência para se Aproximar do Alimento (D); Tempo de Alimentação (E). Resultados obtidos com camundongos KD<sup>HET</sup> n= 5 WT n=15. Barras representam a média ± o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica p < 0,05. ANOVA de 2 vias e teste t.



**Figura 11** Atividade Locomotora em VACHT KD. Atividade Locomotora Horizontal (A), Atividade Locomotora Vertical (B). Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ . Resultados obtidos com camundongos KD<sup>HET</sup> n=13 e WT n=11. Teste t.

#### 7.4 Animais com hipofunção colinérgica não apresentam resposta ao estresse alterada

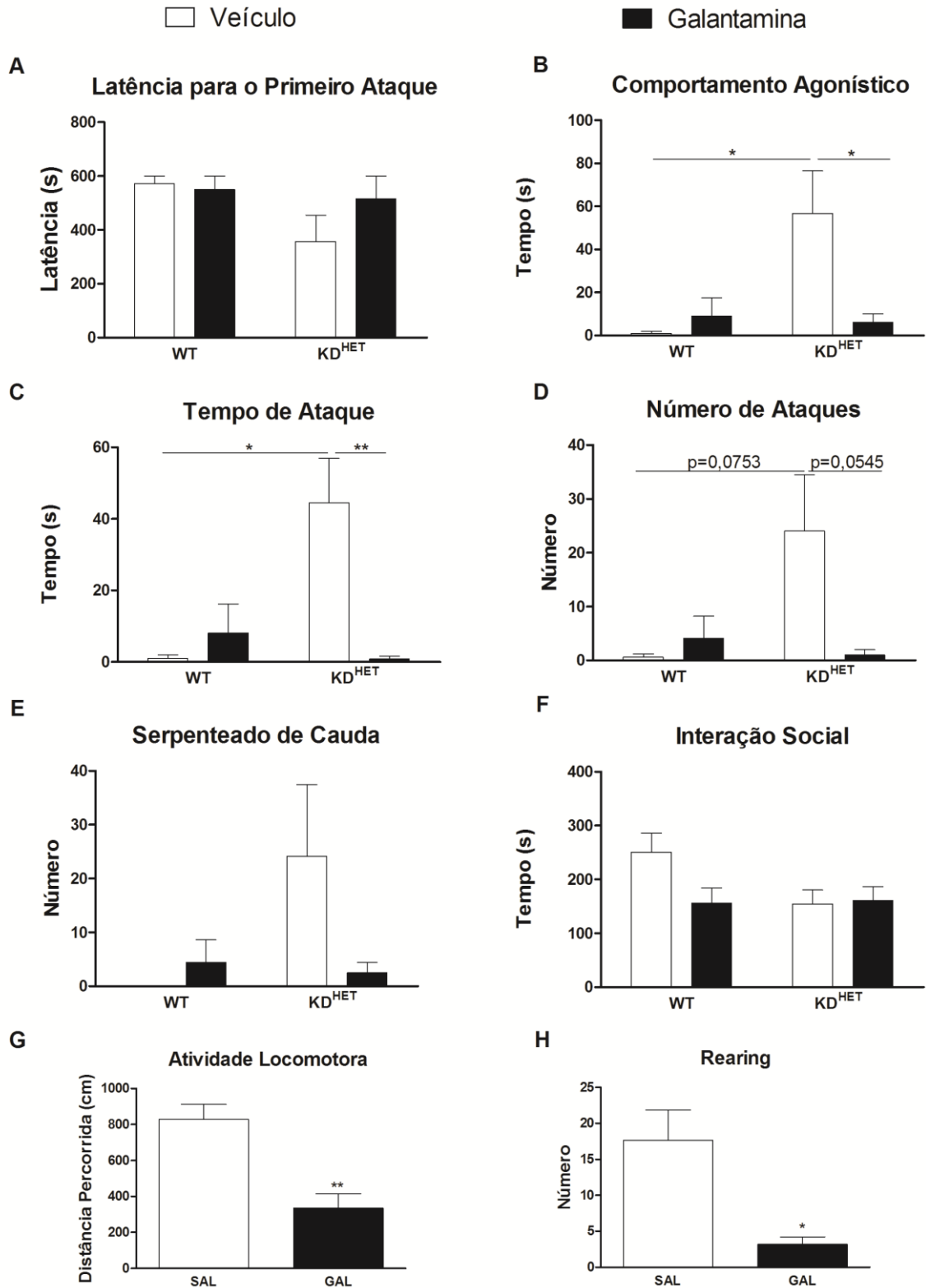
O peso da glândula adrenal foi avaliado e relativizado pelo peso dos animais, esse dado foi utilizado com um indicador indireto da resposta ao estresse. Uma vez que, um aumento do peso dessa glândula é caracterizado como uma resposta crônica ao estresse, gerada por um aumento da atividade do eixo HPA (Peters, Slattery et al. 2014). Não foi observada diferença entre os genótipos no peso relativo da adrenal estatística (Figura 12).



**Figura 12** Peso relativo da glândula adrenal normalizado pelo peso corporal. Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ . Resultados obtidos com camundongos KD<sup>HET</sup> n=10 e WT n=10. Teste t.

## 7.5 Galantamina recupera os efeitos da hipofunção colinérgica sobre a agressividade em camundongos

A galantamina foi utilizada para verificarmos qual o papel efetivo da acetilcolina no comportamento agressivo observado. Interessantemente a GAL reduziu o tempo de comportamento agonístico (Interação:  $F_{(1,21)}= 6,754$   $p=0,0168$ ; Genótipo:  $F_{(1,21)}= 5,521$   $p=0,0228$ ; Droga:  $F_{(1,21)}= 3,572$   $p=0,0726$ ) e ataque (Interação:  $F_{(1,20)}= 10,26$   $p=0,0045$ ; Genótipo:  $F_{(1,20)}= 5,205$   $p=0,0336$ ; Droga:  $F_{(1,20)}= 5,301$   $p=0,0322$ ), apresentando também uma tendência a reduzir o número de ataques (Interação:  $F_{(1,21)}= 5,21$   $p=0,033$ ; Genótipo:  $F_{(1,21)}= 2,808$   $p=0,1086$ ; Droga:  $F_{(1,21)}= 3,044$   $p=0,0957$ ) em  $KD^{HET}$  (Figura 13 B, C e D). Entretanto, a GAL não teve efeito sobre a latência para o primeiro ataque, interação social e número de serpenteados de cauda nesses animais. Nenhum efeito foi notado sobre camundongos WT. Quanto ao comportamento motor, a GAL reduziu tanto a distância percorrida ( $t_{(4)}= 1,310$   $p= 0,0022$ ) quanto o número de *rearings* ( $t_{(4)}= 20,44$   $p= 0,0138$ ) (Figura 13 G e H).

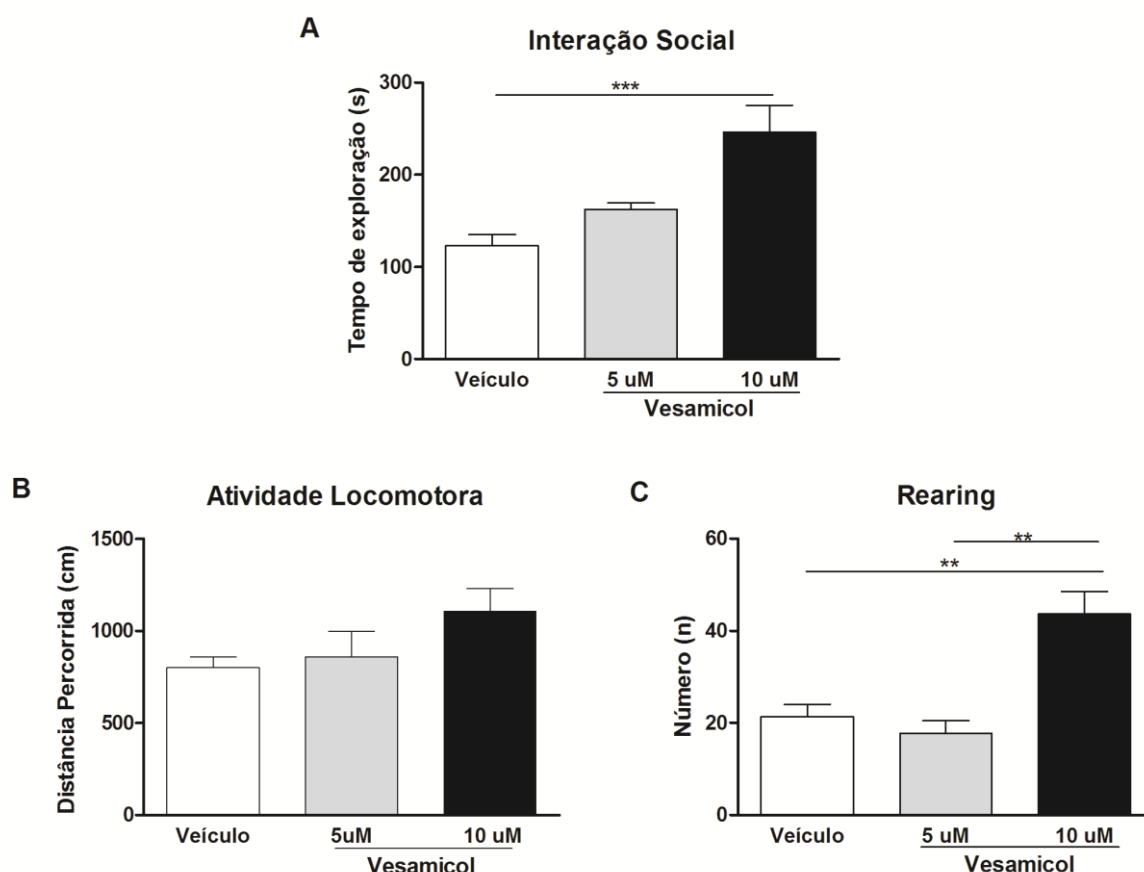


**Figura 13** De A-F teste de residente intruso 30 min após a infusão de galantamina i.p. (0,1 mg/KG). Latência para o primeiro ataque (A); Tempo de Comportamento Agonístico (B); Tempo de Ataque (C); Número de Ataques (D); Número de Serpenteados de Cauda (E); Tempo de Interação Social (F). Resultados obtidos com camundongos KD<sup>HET</sup> SAL n= 6 e GAL n=6; WT SAL n=5 e GAL n=8. Em G e H atividade locomotora 30 minutos após a infusão de GAL em KD<sup>HET</sup>. Atividade locomotora horizontal (G); Atividade locomotora vertical (H). Resultados obtidos com camundongos KD<sup>HET</sup> SAL n=6 e GAL n=6. Barras

representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ ; \*\* indica  $p < 0,01$ . ANOVA de 2 VIAS e teste t.

## 7.6 Redução aguda do tônus colinérgico aumenta a interação social e atividade locomotora de camundongos

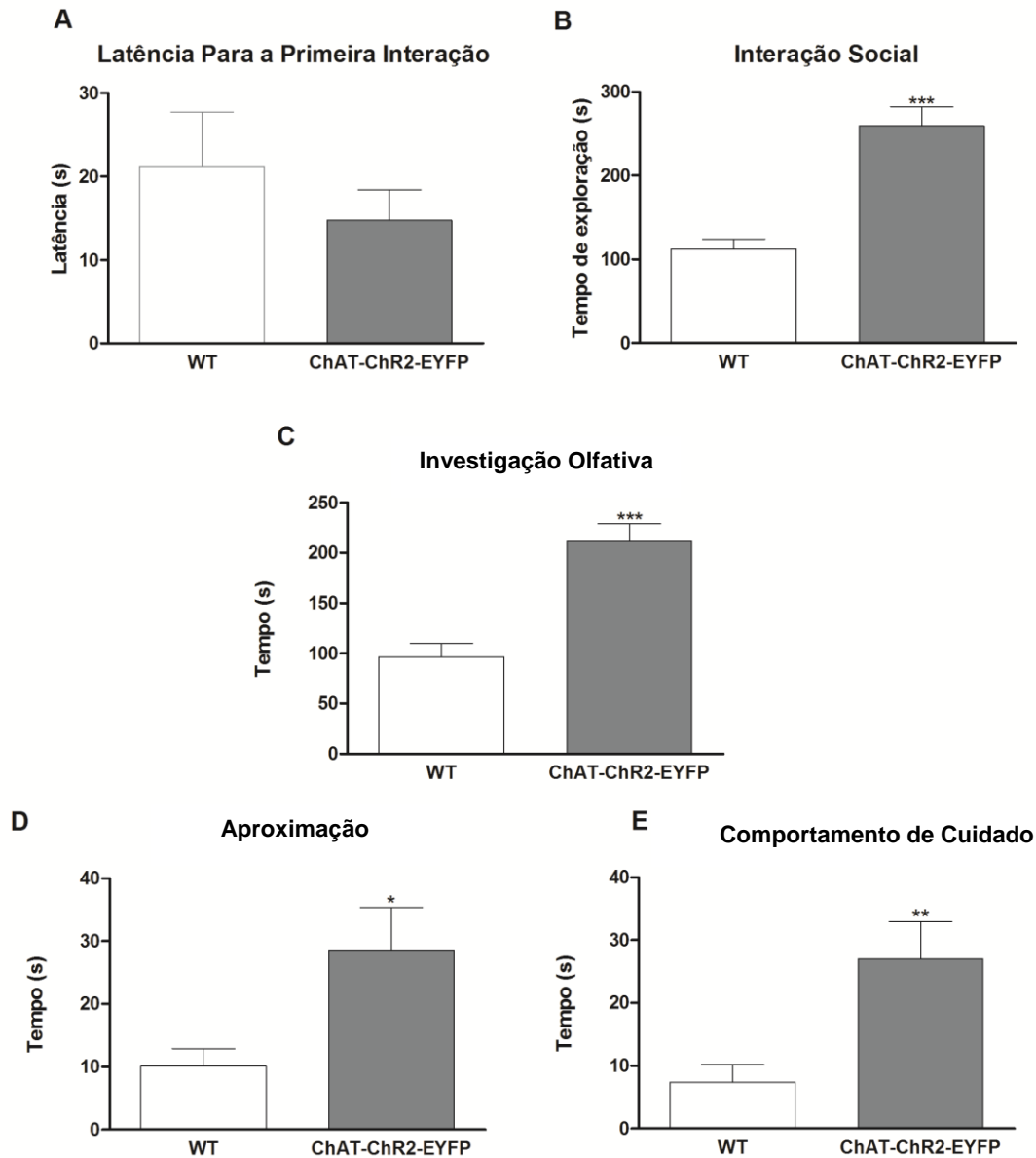
A infusão de vesamicol i.c.v. foi realizada para gerar uma redução aguda do tônus colinérgico em camundongos. A dose de  $10\mu\text{M}$ , aumentou o tempo de investigação social ( $F_{(2,17)}=11,36$   $p=0,001$ ). Essa mesma dose não teve efeito na locomoção horizontal, mas aumentou a vertical, sendo que houve diferença da dose de  $10\mu\text{M}$  quanto comparada ao veículo e a dose de  $5\mu\text{M}$  ( $F_{(2,16)}=14,07$   $p=0,0004$ ), para esse parâmetro. De modo que a dose mais baixa não apresentou efeito motor ou sob o comportamento social (Figura 14).



**Figura 14** Teste de residente intruso e atividade locomotora 20 min após a infusão de vesamicol i.c.v. ( $5\mu\text{M}$  e  $10\mu\text{M}$ ). Tempo de interação social (A); Atividade locomotora horizontal (B); Atividade locomotora vertical (C). Resultados obtidos com camundongos C57BL/6 Veículo  $n=8$ ,  $5\mu\text{M}$   $n=4$  e  $10\mu\text{M}$   $n=6$ . Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ ; \*\* indica  $p < 0,01$  e \*\*\* indica  $p < 0,001$ . ANOVA de 1 VIA.

## **7.7 Animais com hiperfunção colinérgica apresentam o comportamento afiliativo exacerbado**

Camundongos hipercolinérgicos (ChAT-ChR2-EYFP) apresentam um aumento do contato social e comportamento afiliativo quando comparados a selvagens (Figura 15). Esses animais apresentam um aumento da interação social ( $t_{(7)}=3,202$   $p<0,0001$ ) e dos comportamentos de sniffing ( $t_{(7)}=1,366$   $p<0,0001$ ), following ( $t_{(7)}=5,938$   $p=0,0238$ ) e grooming ( $t_{(7)}=4,433$   $p=0,0095$ ). Não houve diferença na latência para o primeiro contato estatística (Figura 15).

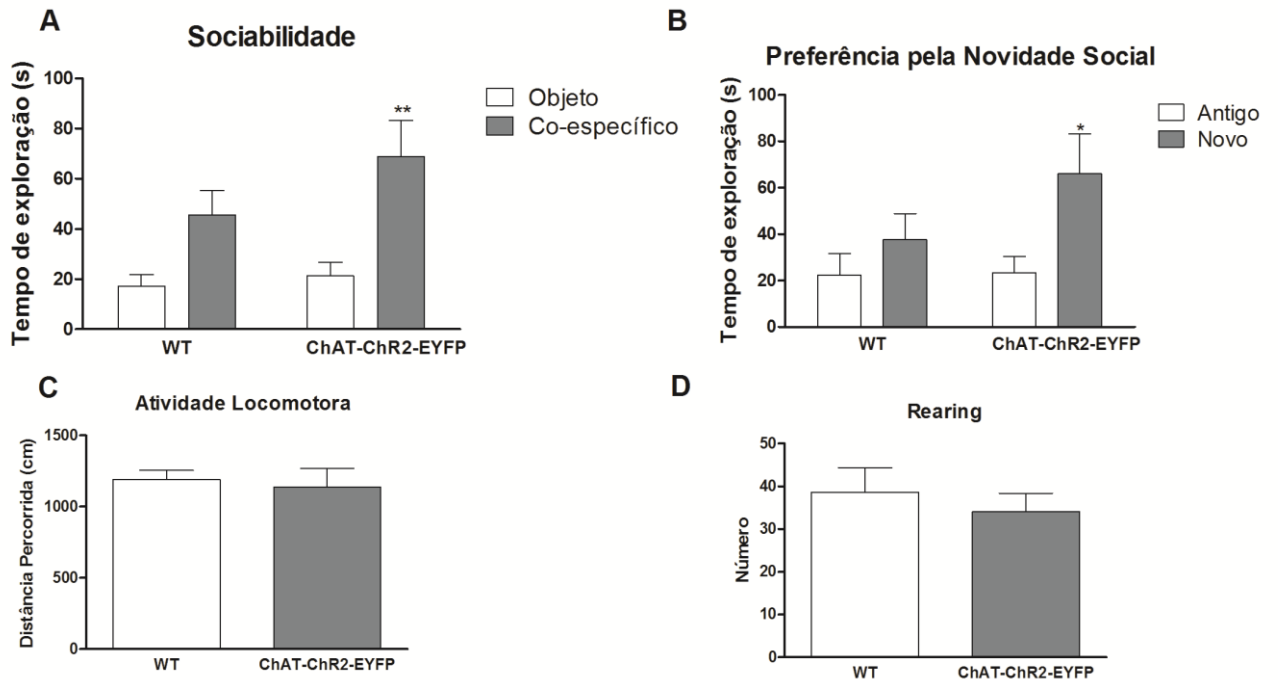


**Figura 15** Teste de residente intruso. Latência para a primeira interação social (A); Tempo de interação social (B); Tempo de sniffing (C); Tempo de following (D); Tempo de grooming (E). Resultados obtidos com camundongos WT n=8 e ChAT-ChR2-EYFP n=8. Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ ; \*\* indica  $p < 0,01$ ; \*\*\* indica  $p < 0,001$ . Teste t.

## 7.8 Animais com hiperfunção colinérgica apresentam sociabilidade mas não locomoção exacerbada

Animais ChAT-ChR2-EYFP não apresentam diferenças na locomoção quando comparados aos WT. Entretanto, apenas os animais com aumento do tônus colinérgico apresentam sociabilidade pelo teste de sociabilidade (Interação:  $F_{(1,36)} = 1,042$   $p = 0,3141$ ; Estímulo:  $F_{(1,36)} = 16,54$   $p = 0,0002$ ; Genótipo:

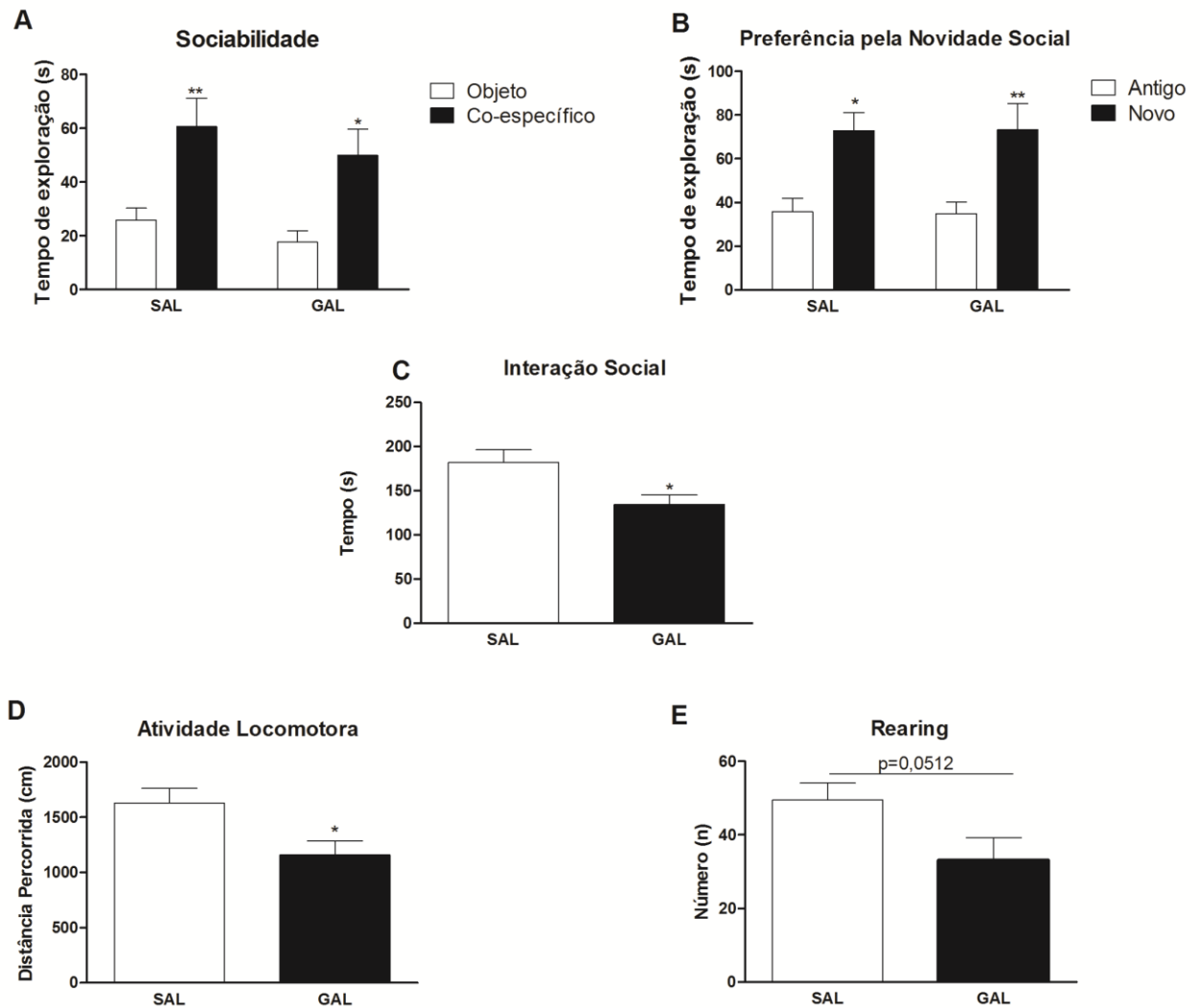
$F_{(1,36)} = 2,129$   $p=0,1532$ ) e preferência pela novidade social (Interação:  $F_{(1,32)} = 1,388$   $p=0,2474$ ; Estímulo:  $F_{(1,32)} = 15,34$   $p=0,0178$ ; Genótipo:  $F_{(1,32)} = 1,593$   $p=0,2160$ ) (Figura 16).



**Figura 16** Sociabilidade e Atividade Locomotora em ChAT-ChR2-EYFP. Sociabilidade (A); Preferência pela Novidade Social (B); Atividade Locomotora Horizontal (C); Atividade locomotora vertical (D). Resultados obtidos com camundongos ChAT-ChR2-EYFP n= 10 WT n=10. Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ ; \*\* indica  $p < 0,01$ . ANOVA de 2 VIAS e tete t.

### 7.9 Aumento agudo do tônus colinérgico diminui a interação social e atividade locomotora de camundongos

A galantamina foi utilizada para aumentar o tônus colinérgico de forma aguda, em camundongos C57BL/6. Interessantemente, a infusão de galantamina diminuí o tempo de interação social (Figura 17 C) ( $F_{(4,5)}=1,5$   $p=0,0255$ ). Embora, não tenha afetado a sociabilidade, pois tanto veículo quanto o grupo droga preferiram o animal ao objeto e a novidade à familiaridade (17 A e B). Apresentando também efeito na locomoção, através de uma redução da distância percorrida (Figura 17 D) ( $t_{(5)}=1,144$   $p=0,0233$ ) e uma tendência de redução do número de *rearings* ( $t_{(5)}=1,771$   $p=0,0512$ ) (Figura 17 E).

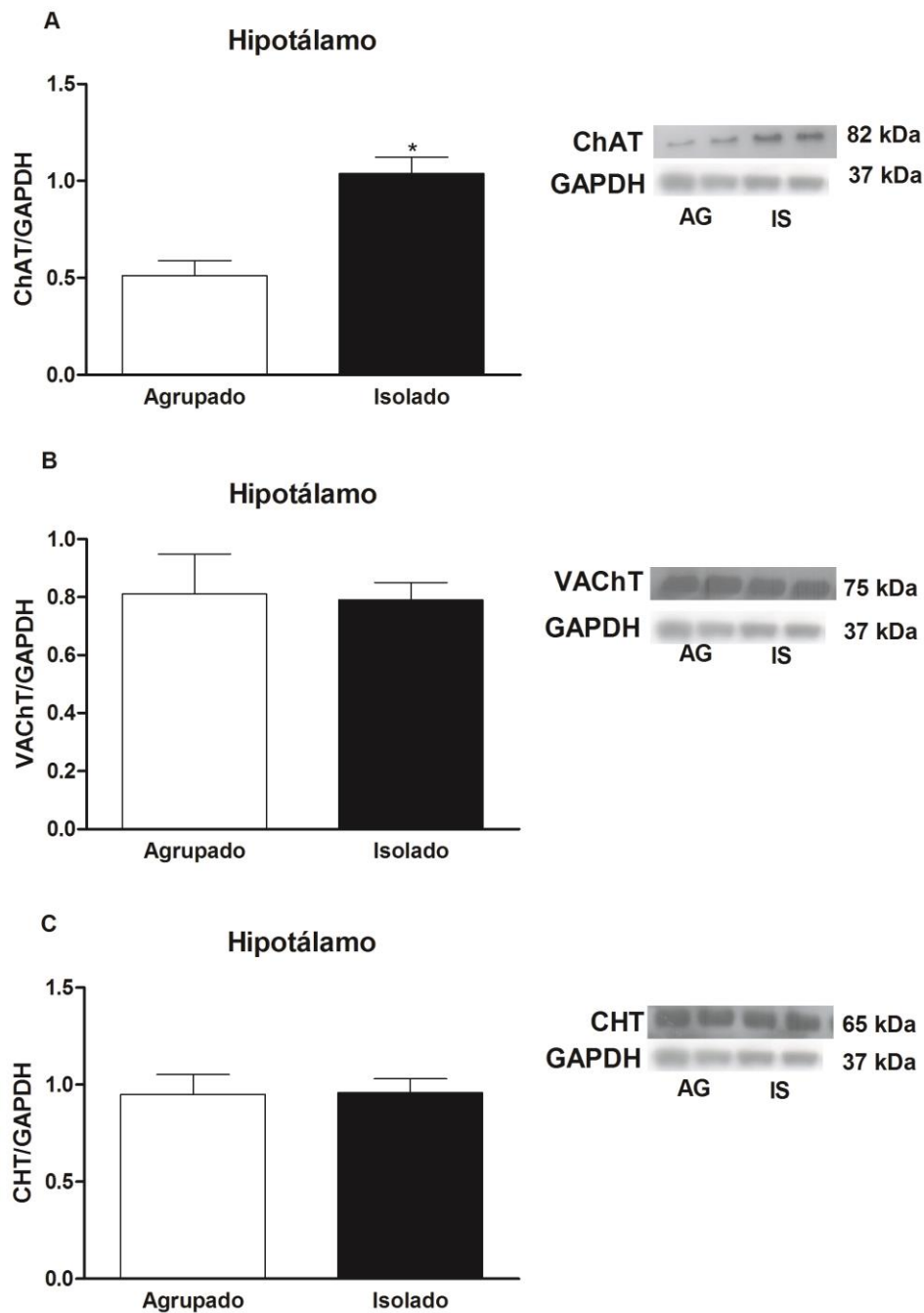


**Figura 17** Interação Social, Sociabilidade e Atividade Locomotora, 30 min após a infusão de galantamina i.p. (0,1 mg/KG). Sociabilidade (A); Preferência pela Novidade Social (B); Interação Social (C); Atividade Locomotora Horizontal (D); Atividade Locomotora Vertical (E). Resultados obtidos com camundongos C57BL6/J SAL n= 5 e GAL n=6. Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ ; \*\* indica  $p < 0,01$ . ANOVA de 2 VIAS e teste t.

## 7.10 Isolamento social aumenta a expressão de ChAT no hipotálamo de camundongos

Com o objetivo de verificar se modelos clássicos de agressividade também alteravam o tônus colinérgico, utilizamos o isolamento social para induzir um aumento do comportamento agressivo, e avaliar as proteínas envolvidas na síntese e liberação de ACh (ChAT, VAcHT e CHT1). O isolamento

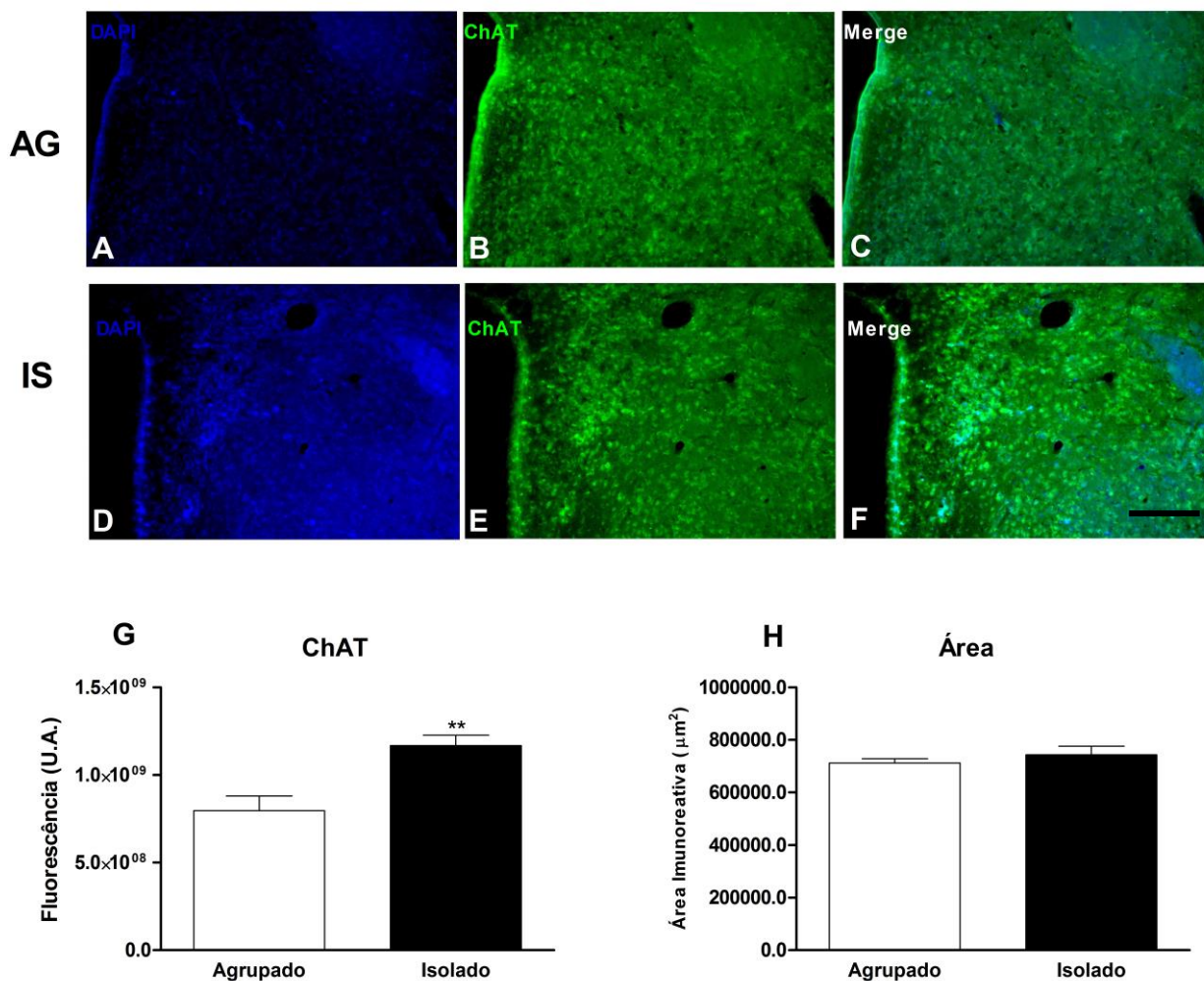
social não alterou a expressão da VAcHT e da CHT1 no hipotálamo. Entretanto houve um aumento na expressão da ChAT ( $t_{(4)}=1,501$   $p=0,0159$ ) (Figura 18A).



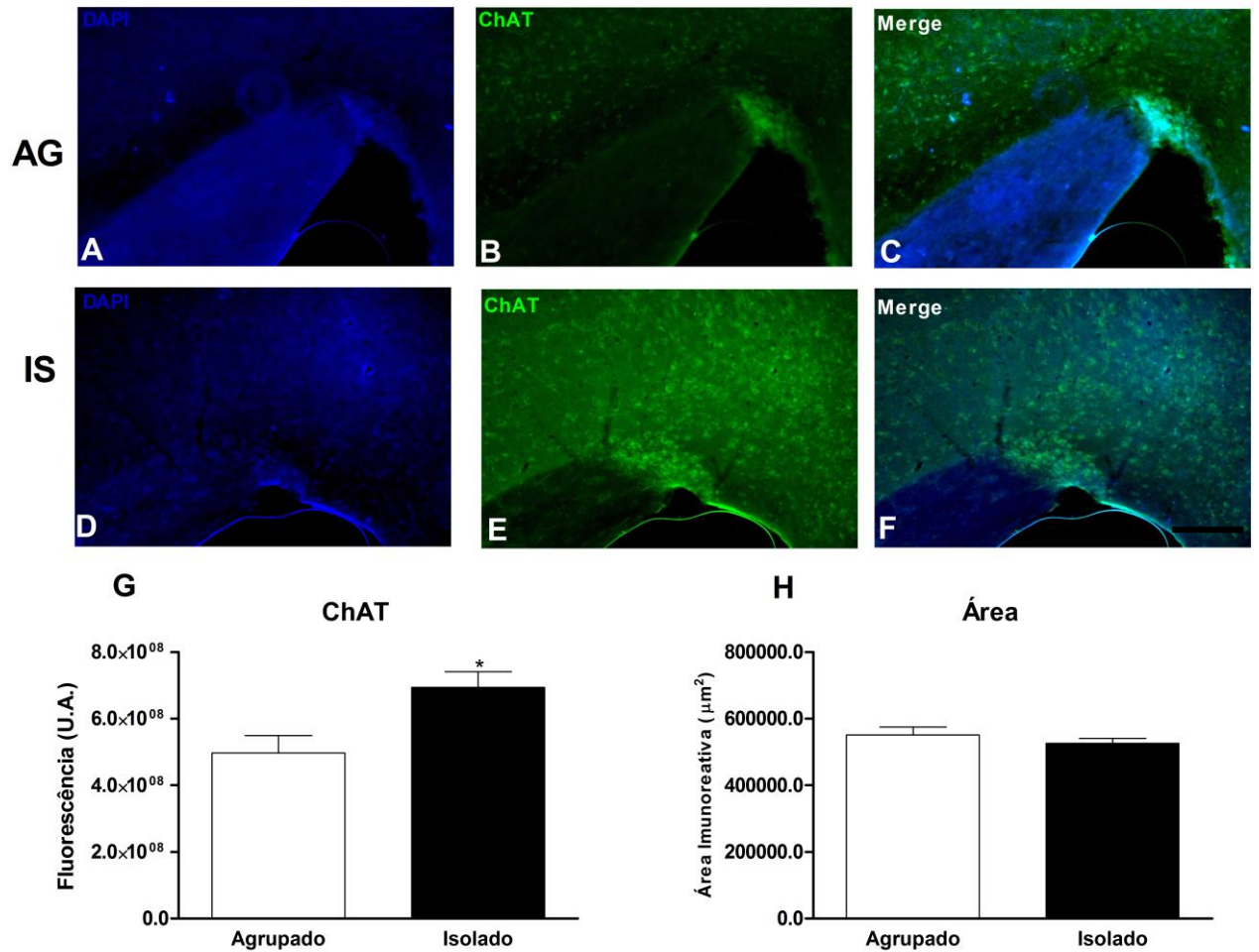
**Figura 18** Expressão de marcadores colinérgicos no hipotálamo de camundongos isolados. ChAT (A), VAcHT (B) e CHT (C). Resultados obtidos com camundongos C57BL6/J ChAT: AG n= 4 IS n= 5 e VAcHT e CHT AG n=4 e IS n=7. Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ . Teste t.

Uma vez que nós verificamos o aumento de ChAT no hipotálamo de animais isolados, decidimos avaliar em quais núcleos hipotalâmicos esse

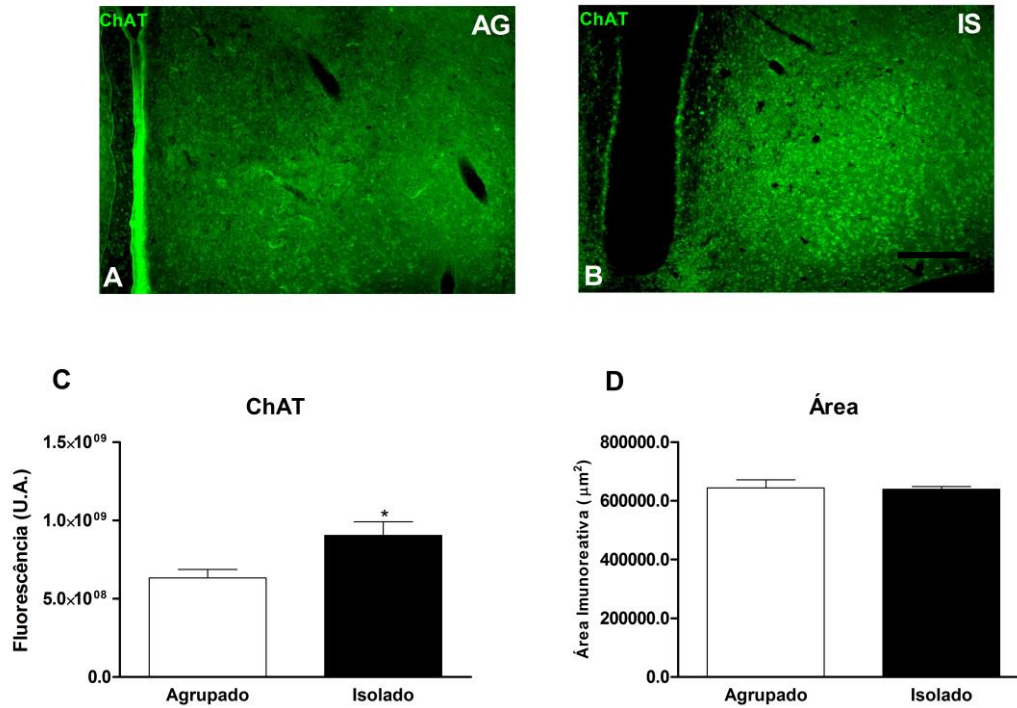
aumento ocorreu. O isolamento social aumentou a expressão de ChAT no PVN ( $F_{(5)}=1,63$   $p=0,0045$ ) (Figura 19), SON ( $F_{(5)}=1,045$   $p=0,0221$ ) (Figura 20) e AH ( $F_{(4)}=2,651$   $p=0,0306$ ) (Figura 21), mas não teve efeito sobre o (LH Figura 22). Não houve diferença entre as áreas demarcadas para todas as regiões analisadas.



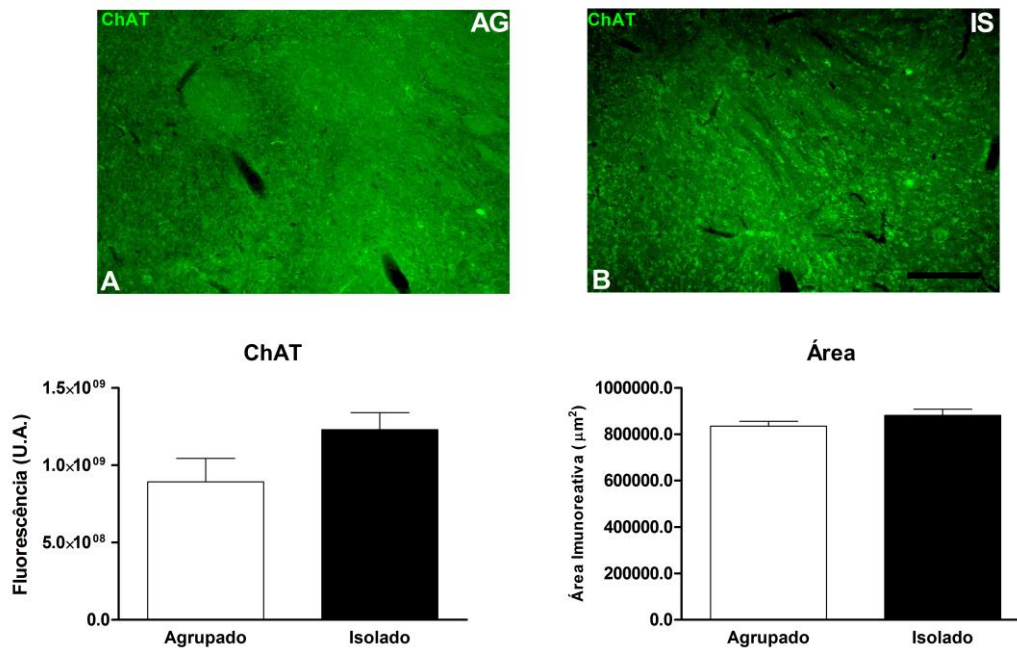
**Figura 19** Expressão de ChAT (verde) e DAPI (azul) no PVN de camundongos isolados. De A-F Imagens ilustrativas: De A-C Animais agrupados e de D-F animais isolados. Em G e H quantificação. Intensidade de Fluorescência (G) e Área Quantificada (H). Aumento de 20x. Resultados obtidos com animais C57BL6/J AG n=5 e IS n=6. \*\* indica  $p<0,01$ . Teste t.



**Figura 20** Expressão de ChAT (verde) e DAPI (azul) no SON de camundongos isolados. De A-F Imagens ilustrativas: De A-C Animais agrupados e de D-F animais isolados. Em G e H quantificação. Intensidade de Fluorescência (G) e Área Quantificada (H). Aumento de 20x. Resultados obtidos com animais C57BL6/J AG n=5 e IS n=6. \* indica  $p < 0,05$ . Teste t.



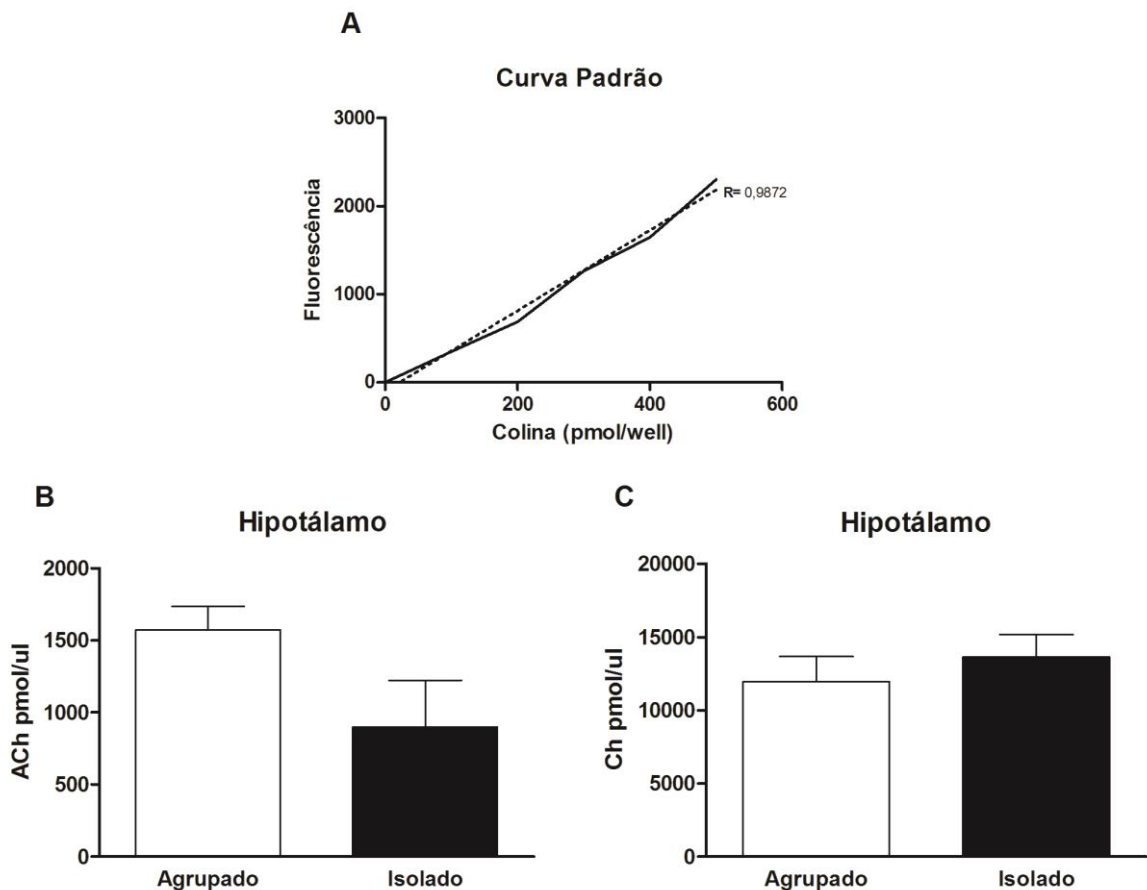
**Figura 21** Expressão de ChAT (verde) AH de camundongos isolados. Em A animais agrupados e em B animais isolados. Em C e D quantificação. Intensidade de Fluorescência (C) e Área Quantificada (D). Aumento de 10x. Resultados obtidos com animais C57BL6/J AG n=5 e IS n=5. \* indica p<0,05. Teste t.



**Figura 22** Expressão de ChAT (verde) LH de camundongos isolados. Em A animais agrupados e em B animais isolados. Em C e D quantificação. Intensidade de Fluorescência (C) e Área Quantificada (D). Aumento de 10x. Resultados obtidos com animais C57BL6/J AG n=5 e IS n=6. \* indica p<0,05. Teste t.

## 7.11 Isolamento social não tem efeito sobre os níveis de acetilcolina hipotalâmicos

O Isolamento social não teve efeito sobre os níveis de ACh e Ch, no hipotálamo, de camundongos C57BL/6 (Figura 23).



**Figura 23** Níveis hipotalâmicos de ACh (B) e Ch (C), medido por ensaio fluorimétrico de Ch . Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). Resultados obtidos com camundongos C57BL/6 AG n=4 e IS n=4. Teste t.

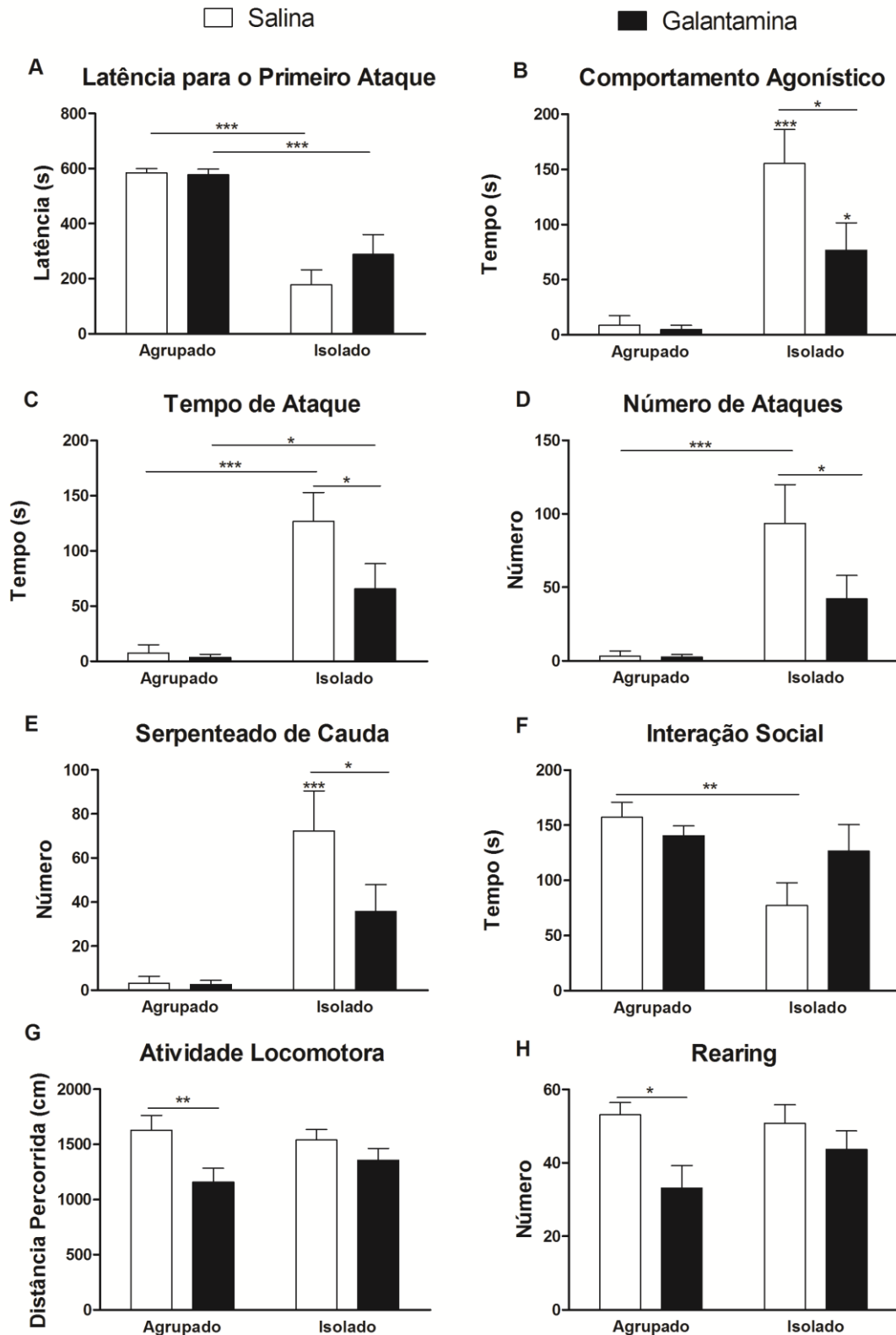
## 7.12 Galantamina reduz a agressividade de camundongos isolados

Supondo que o isolamento social origina uma redução do tônus colinérgico, utilizamos a galantamina para reverter esse estado, e observamos o comportamento agressivo de camundongos. O isolamento social, de três semanas, reduz a latência para o primeiro ataque (Interação:  $F_{(1,39)} = 1,765$   $p = 0,1917$ ; Droga:  $F_{(1,39)} = 1,347$   $p = 0,2529$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,39)} = 61,51$

$p < 0,0001$ ) e o tempo de interação social no teste de RI. Além disso, gera aumento do tempo de comportamento agonístico e ataque, junto com do número de ataques e de serpenteados de cauda (Figura 24 A-F).

A GAL foi hábil em reduzir o tempo de comportamento agonístico (Interação:  $F_{(1,39)} = 3,856$   $p = 0,0567$ ; Droga:  $F_{(1,39)} = 4,624$   $p = 0,0378$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,39)} = 32,75$   $p < 0,0001$ ) e de ataque (Interação:  $F_{(1,39)} = 2,983$   $p = 0,0921$ ; Droga:  $F_{(1,39)} = 3,803$   $p = 0,0584$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,39)} = 29,64$   $p < 0,0001$ ), como também o número de ataques (Interação:  $F_{(1,39)} = 0,0893$   $p = 3,037$ ; Droga:  $F_{(1,39)} = 3,248$   $p = 0,0792$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,39)} = 20,12$   $p < 0,0001$ ). O tratamento também foi eficaz em reverter o número de serpenteados de cauda (Interação:  $F_{(1,39)} = 3,010$   $p = 0,096$ ; Droga:  $F_{(1,39)} = 3,182$   $p = 0,0822$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,39)} = 24,38$   $p < 0,0001$ ). Além disso, o grupo IS GAL não apresenta diferença do AG GAL no tempo de interação social (Interação:  $F_{(1,39)} = 3,776$   $p = 0,0596$ ; Droga:  $F_{(1,39)} = 0,9057$   $p = 0,3471$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,39)} = 7,569$   $p = 0,009$ ) (Figura 24 A-F).

O isolamento não teve efeito sobre a locomoção dos animais. De modo que a galantamina reduziu a distância percorrida (Interação:  $F_{(1,23)} = 1,365$   $p = 0,2542$ ; Droga:  $F_{(1,23)} = 7,003$   $p = 0,0141$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,23)} = 0,2051$   $p = 0,6547$ ) e o número de *rearings* (Interação:  $F_{(1,23)} = 1,547$   $p = 0,2261$ ; Droga:  $F_{(1,23)} = 6,923$   $p = 0,0149$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,23)} = 0,6348$   $p = 0,4337$ ) de camundongos agrupados. Entretanto, de forma surpreendente a GAL não teve efeito sobre a locomoção de camundongos isolados (Figura 24 G e H).

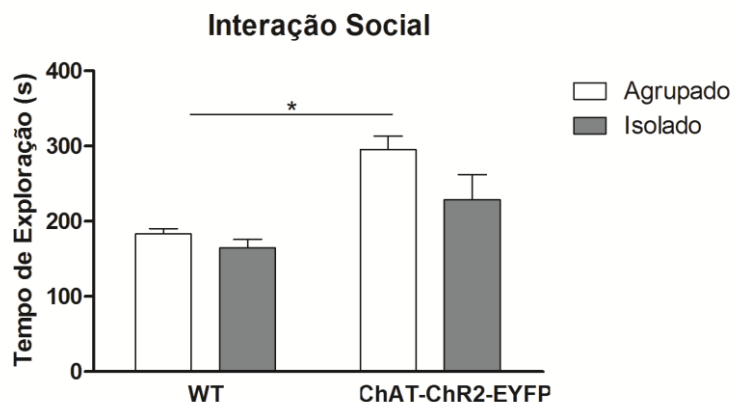


**Figura 24** Teste de residente intruso e atividade locomotora 30 min após a infusão de galantamina i.p. (0,1 mg/KG). Latência para o primeiro ataque (A); Tempo de Comportamento Agonístico (B); Tempo de Ataque (C); Número de Ataques (D); Número de Serpenteados de Cauda (E); Tempo de Interação Social (F). Resultados obtidos com camundongos AG SAL n= 11 e GAL n=11; IS SAL n=10 e GAL n=10. Atividade locomotora horizontal (G) e Atividade locomotora vertical (H). Resultados obtidos com camundongos AG SAL n=8 GAL n=8; IS SAL n=6 e GAL n=6. Barras representam a média ± o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ ; \*\* indica  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . ANOVA de 2 vias.

### 7.13 Camundongos hipercolinérgicos são protegidos dos efeitos do isolamento social na agressividade

Visando verificar se um aumento do tônus colinérgico reverte os efeitos do isolamento social sobre a agressividade, isolamos camundongos ChAT-ChR2-EYFP e medimos o comportamento agressivo por 1, 2 e 3 semanas.

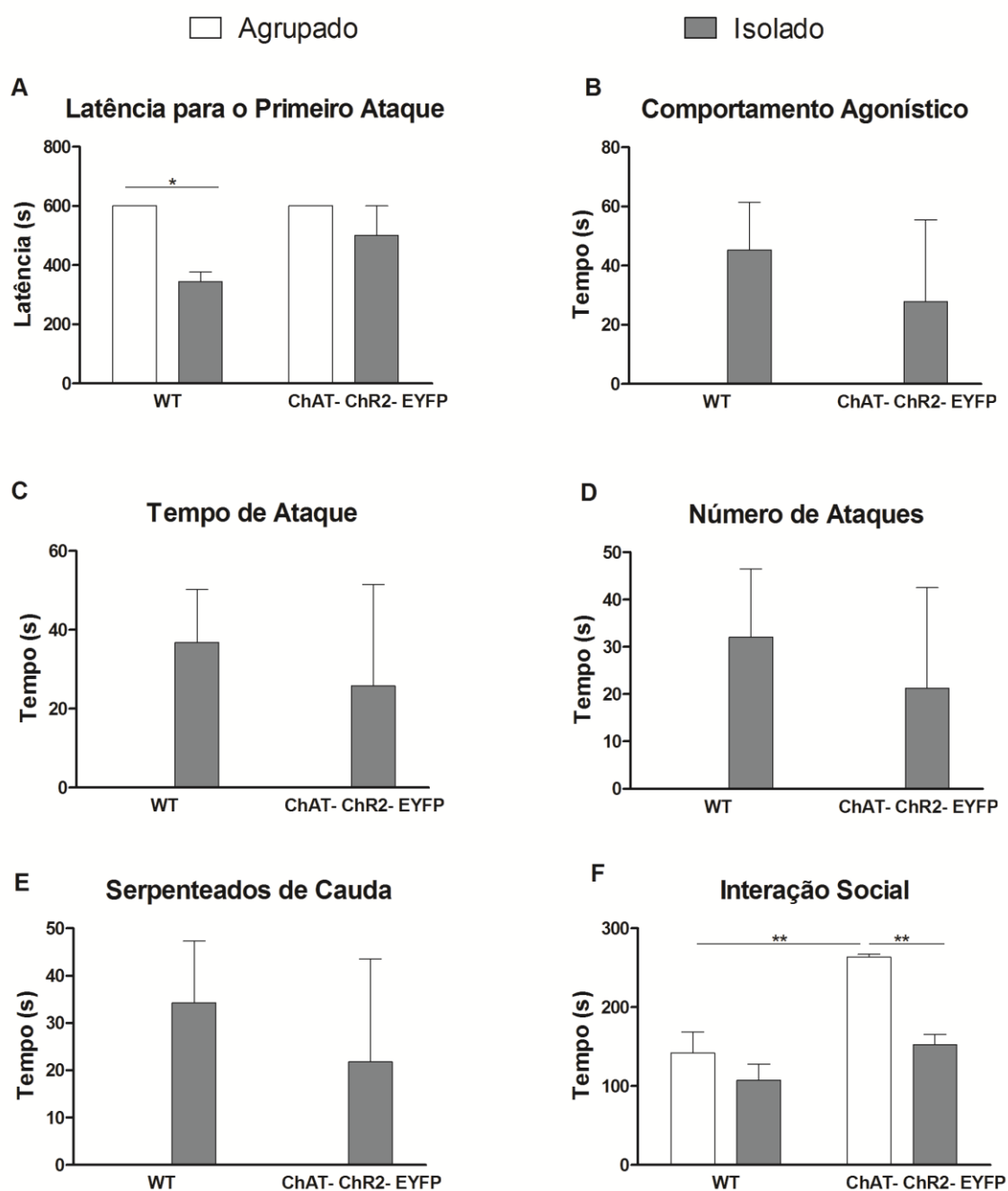
Uma semana de isolamento não foi capaz de induzir agressividade em ambos os genótipos. Entretanto apenas os animais hipercolinérgicos agrupados apresentaram um aumento de interação social quando comparados aos selvagens (Interação:  $F_{(1,10)} = 1,175$   $p=0,3037$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,10)} = 3,68$   $p=0,0840$ ; Genótipo:  $F_{(1,10)} = 15,85$   $p=0,0026$ ) (Figura 25).



**Figura 25** Teste de residente intruso em camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP isolados por 1 semana. Tempo de interação social. Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ . Resultados obtidos com camundongos AG: WT  $n=3$  e ChAT-ChR2-EYFP  $n=3$ ; IS: WT  $n=4$  e ChAT-ChR2-EYFP  $n=4$ . ANOVA de 2 Vias.

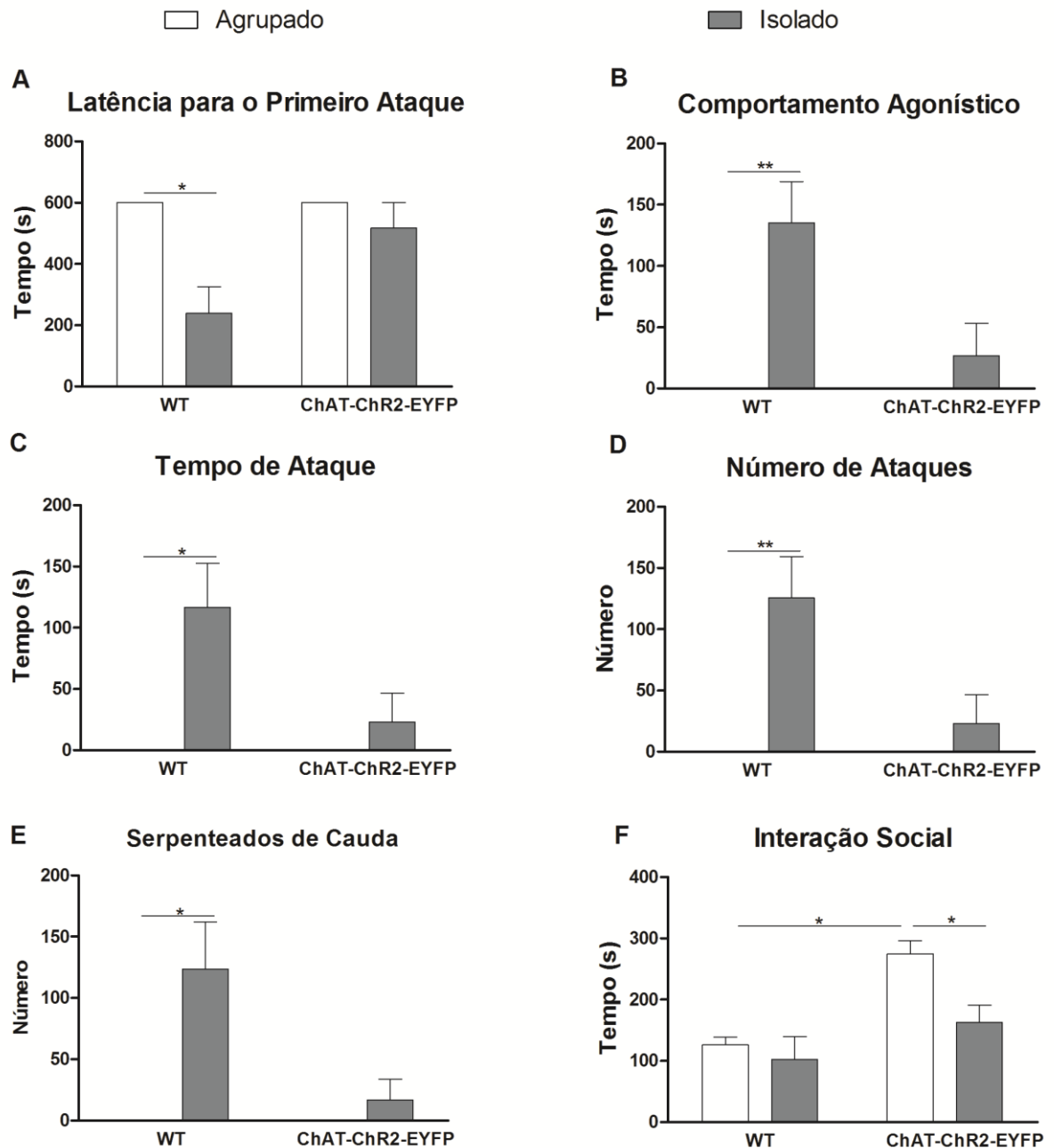
Após duas semanas de isolamento ainda foi possível observar uma interação social aumentada em camundongos ChAT-ChR2-EYFP agrupados. Camundongos hipercolinérgicos isolados apresentaram uma redução do tempo de exploração social quando comparados aos agrupados (Figura 26F) (Interação:  $F_{(1,10)} = 4,467$   $p=0,0607$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,10)} = 16,19$   $p=0,0024$ ; Genótipo:  $F_{(1,10)} = 21,21$   $p=0,001$ ). Além disso, os WT isolados apresentaram uma redução da latência para o primeiro ataque quando comparados aos agrupados

(Interação:  $F_{(1,10)} = 1,576$   $p=0,2379$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,10)} = 8,193$   $p=0,0169$ ; Genótipo:  $F_{(1,10)} = 1,576$   $p=0,2379$ ) (Figura 26A). Os demais parâmetros da agressividade permaneceram inalterados.



**Figura 26** Teste de residente intruso em camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP isolados por 2 semanas. Latência para o primeiro ataque (A); Tempo de Comportamento Agonístico (B); Tempo de Ataque (C); Número de Ataques (D); Número de Serpenteados de Cauda (E); Tempo de Interação Social (F). Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ ; \*\* indica  $p < 0,01$ . Resultados obtidos com camundongos AG: WT  $n=3$  e ChAT-ChR2-EYFP  $n=3$ ; IS: WT  $n=4$  e ChAT-ChR2-EYFP  $n=4$ . ANOVA de 2 vias.

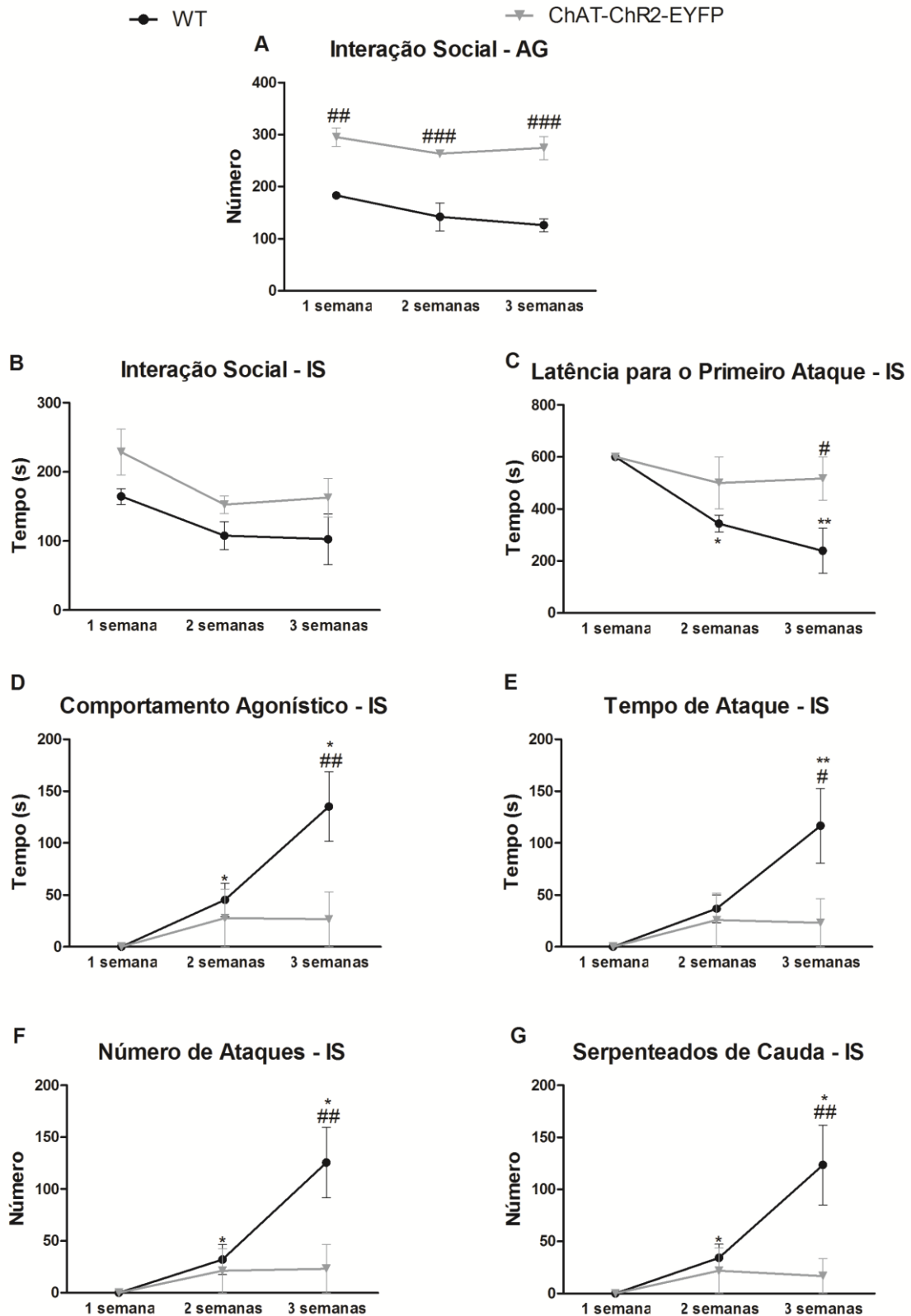
Como esperado ainda no tempo de três semanas foi observado o aumento da sociabilidade dos camundongos hipercolinérgicos agrupados com relação aos selvagens. Os animais isolados apresentaram uma redução da interação social quando comparados aos agrupados, semelhantemente ao resultado obtido no tempo de duas semanas (Interação:  $F_{(1,10)}= 2,245$   $p=0,1649$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,10)}= 5,28$   $p=0,0444$ ; Genótipo:  $F_{(1,10)}= 12,59$   $p=0,0053$ ). Além disso, o isolamento social aumentou a agressividade nos WT. Esses animais apresentaram: redução da latência para o primeiro ataque (Interação:  $F_{(1,10)}= 3,842$   $p=0,0748$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,10)}= 9,835$   $p=0,0106$ ; Genótipo:  $F_{(1,10)}= 3,842$   $p=0,0748$ ), aumento do tempo de comportamento agonístico (Interação:  $F_{(1,10)}= 4,592$   $p=0,0578$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,10)}= 10,16$   $p=0,0097$ ; Genótipo:  $F_{(1,10)}= 4,592$   $p=0,0578$ ) e de ataque (Interação:  $F_{(1,10)}= 3,39$   $p=0,0954$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,10)}= 7,601$   $p=0,0202$ ; Genótipo:  $F_{(1,10)}= 3,39$   $p=0,0954$ ), aumento do número de ataques (Interação:  $F_{(1,10)}= 4,405$   $p=0,0622$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,10)}= 9,323$   $p=0,0122$ ; Genótipo:  $F_{(1,10)}= 4,405$   $p=0,0622$ ) e serpenteados de cauda (Interação:  $F_{(1,10)}= 4,637$   $p=0,0567$ ; Condição Ambiental:  $F_{(1,10)}= 8,004$   $p=0,0179$ ; Genótipo:  $F_{(1,10)}= 4,637$   $p=0,0567$ ). Já nos animais ChAT-ChR2-EYFP, não houve aumento significativo da agressividade quando comparamos isolados e agrupados. (Figura 27).



**Figura 27** Teste de residente intruso em camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP isolados por 3 semanas. Latência para o primeiro ataque (A); Tempo de Comportamento Agonístico (B); Tempo de Ataque (C); Número de Ataques (D); Número de Serpenteados de Cauda (E); Tempo de Interação Social (F). Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ ; \*\* indica  $p < 0,01$ . Resultados obtidos com camundongos AG: WT  $n=3$  e ChAT-ChR2-EYFP  $n=3$ ; IS: WT  $n=4$  e ChAT-ChR2-EYFP  $n=4$ . ANOVA de 2 Vias.

Por fim, quando comparamos o desempenho dos animais isolados ao longo das três semanas de isolamento notamos que apenas os selvagens aumentam o comportamento agressivo. Animais WT isolados apresentam uma menor latência para o primeiro ataque com 2 e 3 semanas de isolamento quando

comparados com 1 semana (Interação:  $F_{(1,18)}= 2,287$   $p=0,1303$ ; Genótipo:  $F_{(1,18)}= 7,412$   $p=0,014$ ; Tempo:  $F_{(1,18)}= 6,535$   $p=0,0074$ ) (Figura 28 A). Além disso, no tempo de três semanas esses animais apresentam uma latência menor que animais ChAT-ChR2-EYFP isolados. Semelhantemente, esses animais apresentam um aumento do tempo de comportamento agonístico (Interação:  $F_{(1,18)}= 3,561$   $p=0,0498$ ; Genótipo:  $F_{(1,18)}= 5,549$   $p=0,03$ ; Tempo:  $F_{(1,18)}= 6,852$   $p=0,0061$ ), número de ataques (Interação:  $F_{(1,18)}= 4,018$   $p=0,0361$ ; Genótipo:  $F_{(1,18)}= 5,417$   $p=0,0318$ ; Tempo:  $F_{(1,18)}= 7,230$   $p=0,005$ ) e serpenteados de cauda (Interação:  $F_{(1,18)}= 4,258$   $p=0,0306$ ; Genótipo:  $F_{(1,18)}= 5,926$   $p=0,0256$ ; Tempo:  $F_{(1,18)}= 6,231$   $p=0,0088$ ) a partir de duas semanas de isolamento, sendo considerados significativamente diferentes dos animais hipercolinérgicos isolados no tempo de 1 semana (Figura 28 C,E e F). O tempo de ataque só se encontra aumentado nos controles isolados com três semanas quando comparados com uma, e esses animais também são significativamente mais agressivos que os hipercolinérgicos isolados (Interação:  $F_{(1,18)}= 2,917$   $p=0,0799$ ; Genótipo:  $F_{(1,18)}= 4,066$   $p=0,0589$ ; Tempo:  $F_{(1,18)}= 5,494$   $p=0,0137$ ) (Figura 28 D). Não foi notada diferença na interação social em ambos os genótipos isolados ao longo do tempo (Interação:  $F_{(1,18)}= 0,07864$   $p=0,9247$ ; Genótipo:  $F_{(1,18)}= 7,299$   $p=0,0146$ ; Tempo:  $F_{(1,18)}= 4,34$   $p=0,029$ ). Durante os três tempos os animais agrupados ChAT-ChR2-EYFP apresentaram maior tempo de exploração social (Interação:  $F_{(1,12)}= 0,6059$   $p=0,5616$ ; Genótipo:  $F_{(1,12)}= 83,96$   $p<0,0001$ ; Tempo:  $F_{(1,12)}= 3,291$   $p=0,0726$ ) (Figura 28 A e G).



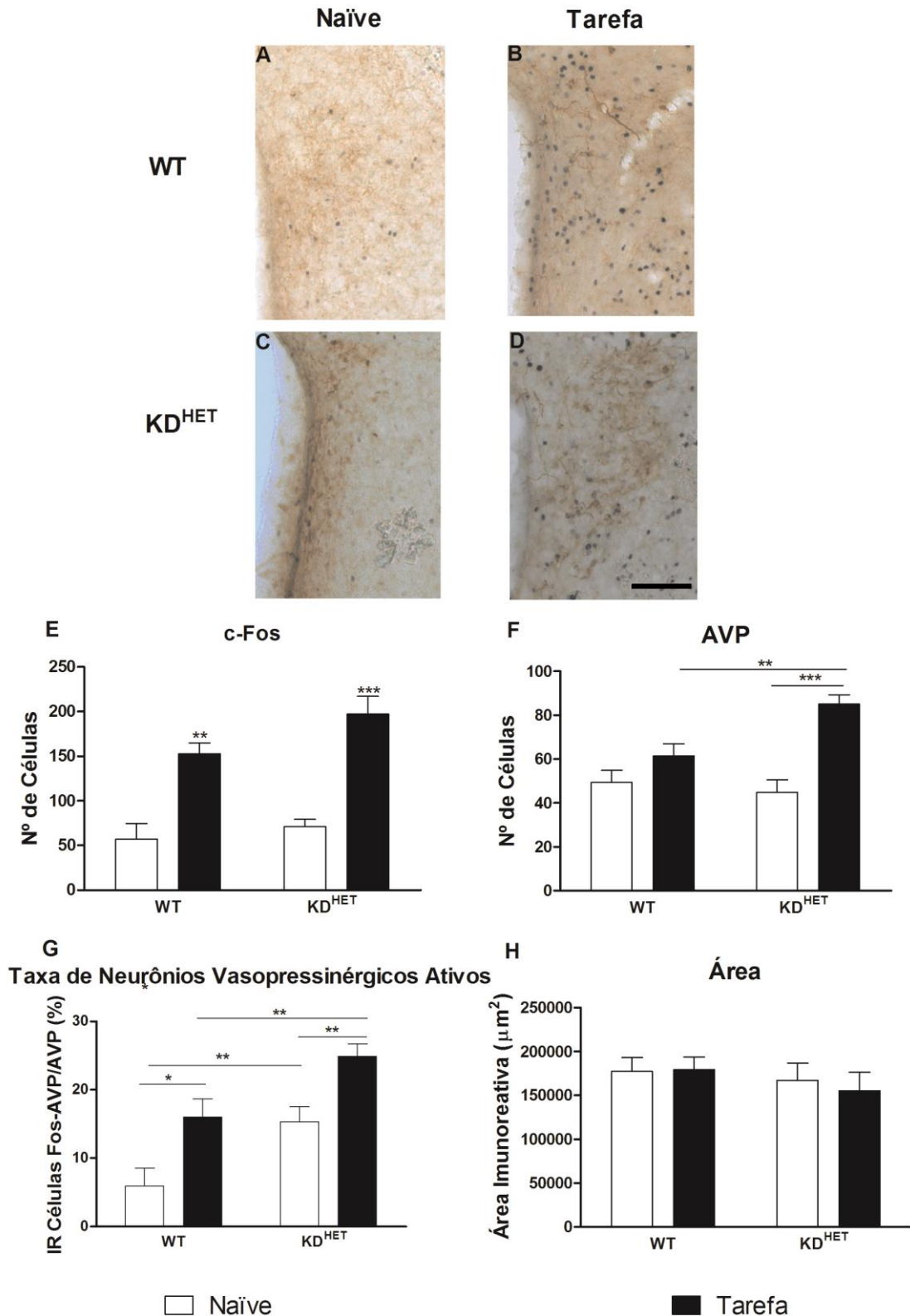
**Figura 28** Teste de residente intruso em camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP isolados por 3 semanas. Animais Agrupado (AG): Em A Interação Social. Animais Isolados (IS): Interação Social (B); Latência para o primeiro ataque (C); Comportamento Agonístico (D); Tempo de Ataque (E); Número de Ataques (F). Número de Serpenteados. Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.).\* indica  $p < 0,05$ ; \*\* indica  $p < 0,01$ , vs 1 semana de isolamento; #  $p < 0,05$ , ## indica  $p < 0,01$ , WTvsChAT-ChR2-EYFP.

Resultados obtidos com camundongos AG: WT n=3 e ChAT-ChR2-EYFP n=3; IS: WT n=4 e ChAT-ChR2-EYFP n=4. ANOVA de 2 Vias.

#### **7.14 Animais com hipofunção colinérgica apresentam a atividade de neurônios vasopressinérgicos e a expressão de vasopressina no hipotálamo, BNST e septo lateral aumentada**

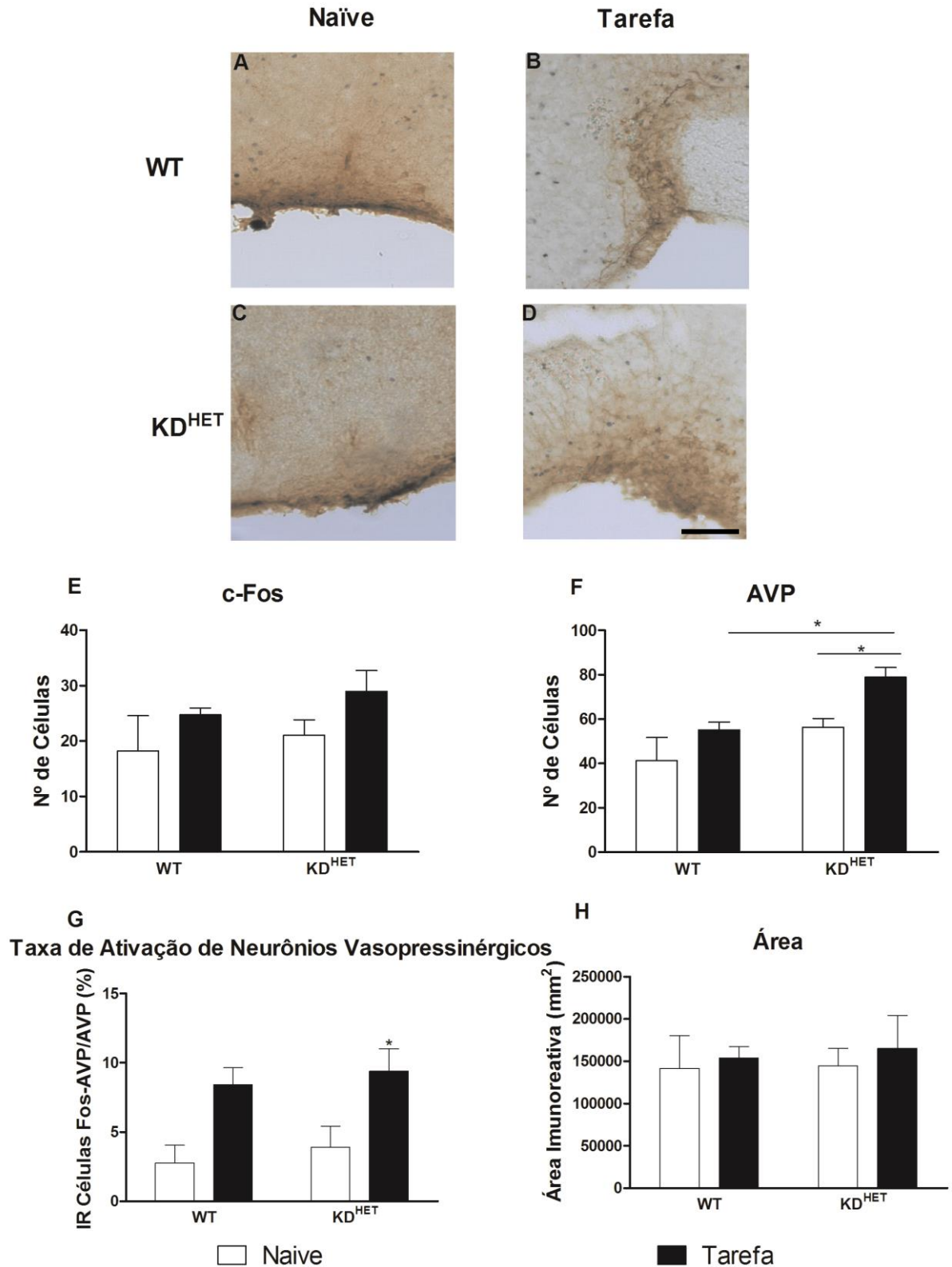
Uma vez que o sistema colinérgico e o vasopressinérgico interagem e se contra regulam, utilizamos camundongos VChT KD na tarefa de RI, posteriormente fizemos uma imunohistoquímica para AVP e c-Fos, visando mapear a atividade dos circuitos vasopressinérgicos nessa linhagem.

Observamos que ambos os genótipos ativaram o PVN em resposta a tarefa, mas não houve diferença na expressão de c-Fos entre os genótipos (Interação:  $F_{(1,18)} = 0,8786$   $p = 0,361$ ; Tarefa:  $F_{(1,18)} = 45,75$   $p < 0,0001$ ; Genótipo:  $F_{(1,18)} = 3,162$   $p = 0,0922$ ). O RI aumentou a expressão de AVP apenas em camundongos heterozigotos, sendo que o grupo  $KD^{HET}$  tarefa apresentou um maior número de neurônios vasopressinérgicos que o grupo WT tarefa (Interação:  $F_{(1,18)} = 7,173$   $p = 0,0149$ ; Tarefa:  $F_{(1,18)} = 24,72$   $p < 0,0001$ ; Genótipo:  $F_{(1,18)} = 3,347$   $p = 0,0833$ ). Quando analisamos a taxa de neurônios vasopressinérgicos ativos observamos que a tarefa aumenta a atividade dos neurônios AVP em ambos os genótipos. Entretanto, animais  $KD^{HET}$  apresentam uma atividade basal e em resposta a tarefa elevada quando comparados aos WT (Interação:  $F_{(1,18)} = 0,00862$   $p = 0,9271$ ; Tarefa:  $F_{(1,18)} = 17,91$   $p = 0,0005$ ; Genótipo:  $F_{(1,18)} = 15,31$   $p = 0,001$ ). Não houve diferença entre os grupos na área amostrada para quantificação (Figura 29).



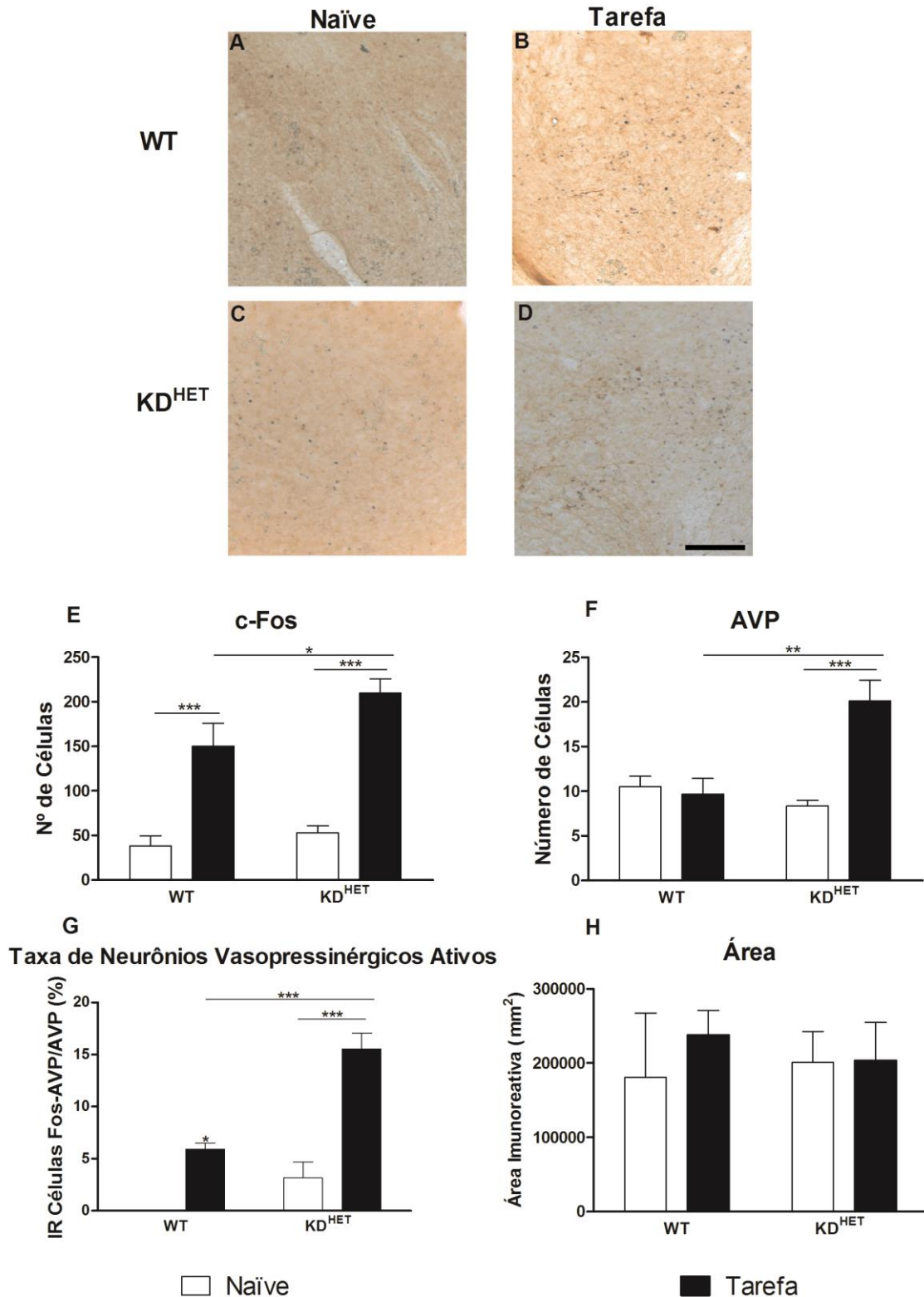
**Figura 29** Expressão de AVP e c-Fos no PVN de camundongos VAcT KD pós RI, pela técnica de imunohistoquímica. Em castanho neurônios AVP-positivos e em azul neurônios c-Fos positivos. De A-D imagens ilustrativas: WT Naïve (A) e Tarefa (B); KD<sup>HET</sup> Naïve (C) e Tarefa (D). Aumento de 20x. De G-H quantificação das imagens: número de células c-FOS positivas (E); número de células AVP positivas (F); taxa de neurônios vasopressinérgicos ativos (G); área quantificada (H). Barras representam a média ± o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica p<0,05; \*\* indica p<0,01; \*\*\* indica p<0,001. Resultados obtidos com camundongos WT Naïve n=4 e Tarefa n=5; KD<sup>HET</sup> Naïve n=6 e Tarefa n=7. ANOVA de 2 Vias.

A atividade do SON não foi afetada pelo RI. Entretanto, esse núcleo aumentou a expressão de AVP em resposta à tarefa, sendo que o grupo  $KD^{HET}$  tarefa apresentou mais neurônios vasopressinérgicos que o grupo WT tarefa (Interação:  $F_{(1,16)} = 0,00862$   $p=0,9271$ ; Tarefa:  $F_{(1,16)} = 17,91$   $p=0,0005$ ; Genótipo:  $F_{(1,16)} = 15,31$   $p=0,001$ ). Apenas os animais heterozigotos aumentaram a taxa de ativação dos neurônios vasopressinérgicos em resposta a tarefa (Interação:  $F_{(1,16)} = 0,5999$   $p=0,4499$ ; Tarefa:  $F_{(1,16)} = 10,42$   $p=0,0053$ ; Genótipo:  $F_{(1,16)} = 11,79$   $p=0,0034$ ). Não houve diferença entre as áreas quantificadas (Figura 30).



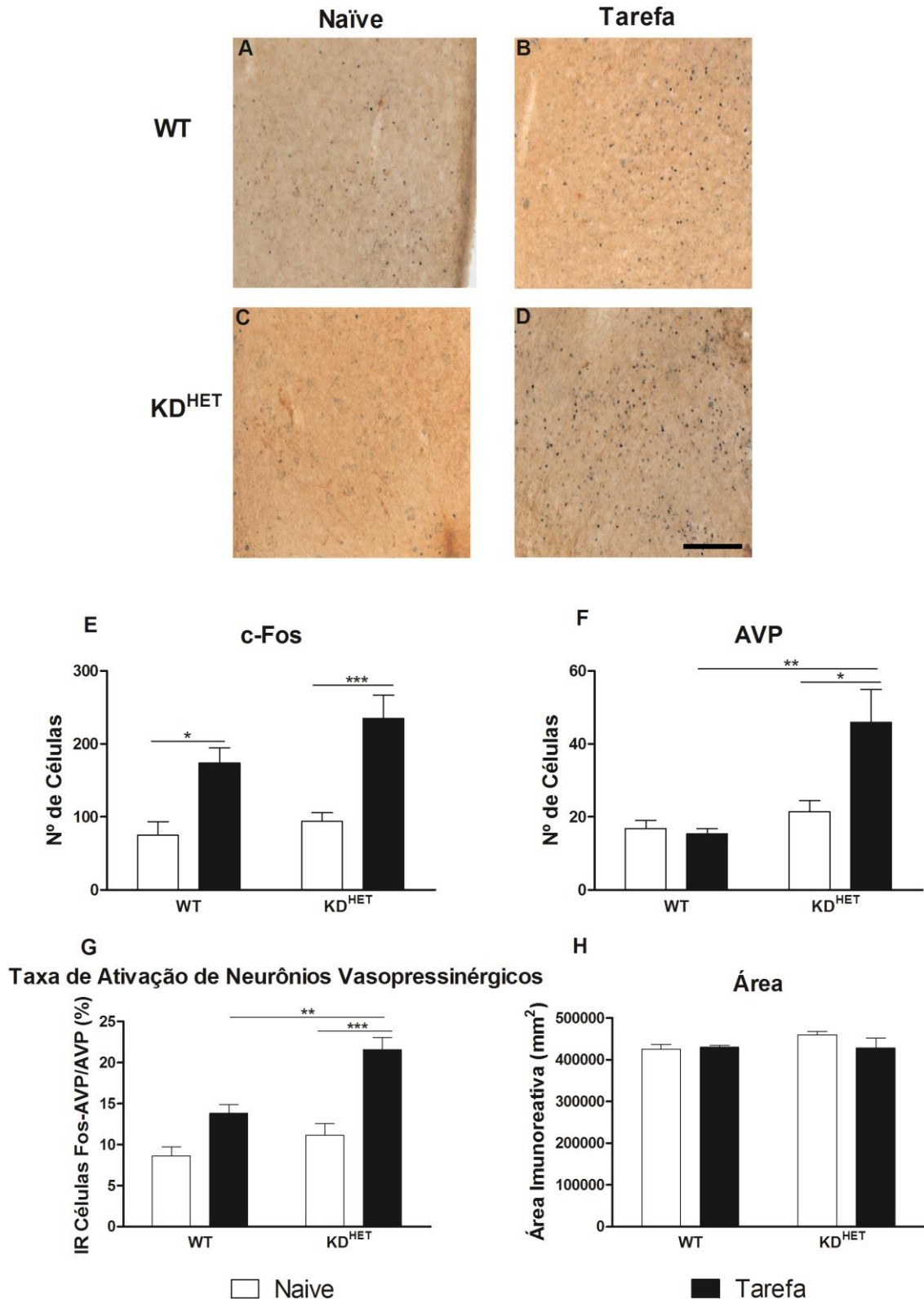
**Figura 30** Expressão de AVP e c-Fos no SON de camundongos VACHT KD que pós RI, pela técnica de imunohistoquímica. Em castanho neurônios AVP-positivos e em azul neurônios c-Fos positivos. De A-D imagens ilustrativas: WT Naïve (A) e Tarefa (B); KD<sup>HET</sup> Naïve (C) e Tarefa (D). Aumento de 20x. De G-H quantificação das imagens: número de células c-FOS positivas (E); número de células AVP positivas (F); taxa de neurônios vasopressinérgicos ativos (G); área quantificada (H). Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ . Resultados obtidos com camundongos WT Naïve  $n=4$  e Tarefa  $n=4$ ; KD<sup>HET</sup> Naïve  $n=6$  e Tarefa  $n=6$ . ANOVA de 2 Vias.

O teste comportamental recrutou o hipotálamo lateral, de modo que animais  $KD^{HET}$  tarefa apresentaram mais neurônios c-FOS positivos que os WT tarefa (Interação:  $F_{(1,18)}= 1,785$   $p=0,1982$ ; Tarefa:  $F_{(1,18)}= 63,93$   $p<0,0001$ ; Genótipo:  $F_{(1,18)}= 4,838$   $p=0,0412$ ). Mais uma vez, a expressão de vasopressina aumentou apenas no grupo heterozigoto em resposta ao RI, sendo que os animais  $KD^{HET}$  tarefa apresentaram mais neurônios AVP que os WT tarefa (Interação:  $F_{(1,18)}= 11,87$   $p=0,0029$ ; Tarefa:  $F_{(1,18)}= 8,946$   $p=0,0078$ ; Genótipo:  $F_{(1,18)}= 5,171$   $p=0,0354$ ). A atividade de neurônios vasopressinérgicos foi ampliada pela tarefa nos dois genótipos, sendo maior no grupo heterozigoto tarefa quando comparado ao selvagem tarefa (Interação:  $F_{(1,18)}= 5,757$   $p=0,0275$ ; Tarefa:  $F_{(1,18)}= 45,88$   $p<0,0001$ ; Genótipo:  $F_{(1,18)}= 22,30$   $p=0,0002$ ). Não foi observado diferenças entre as áreas quantificadas (Figura 31).



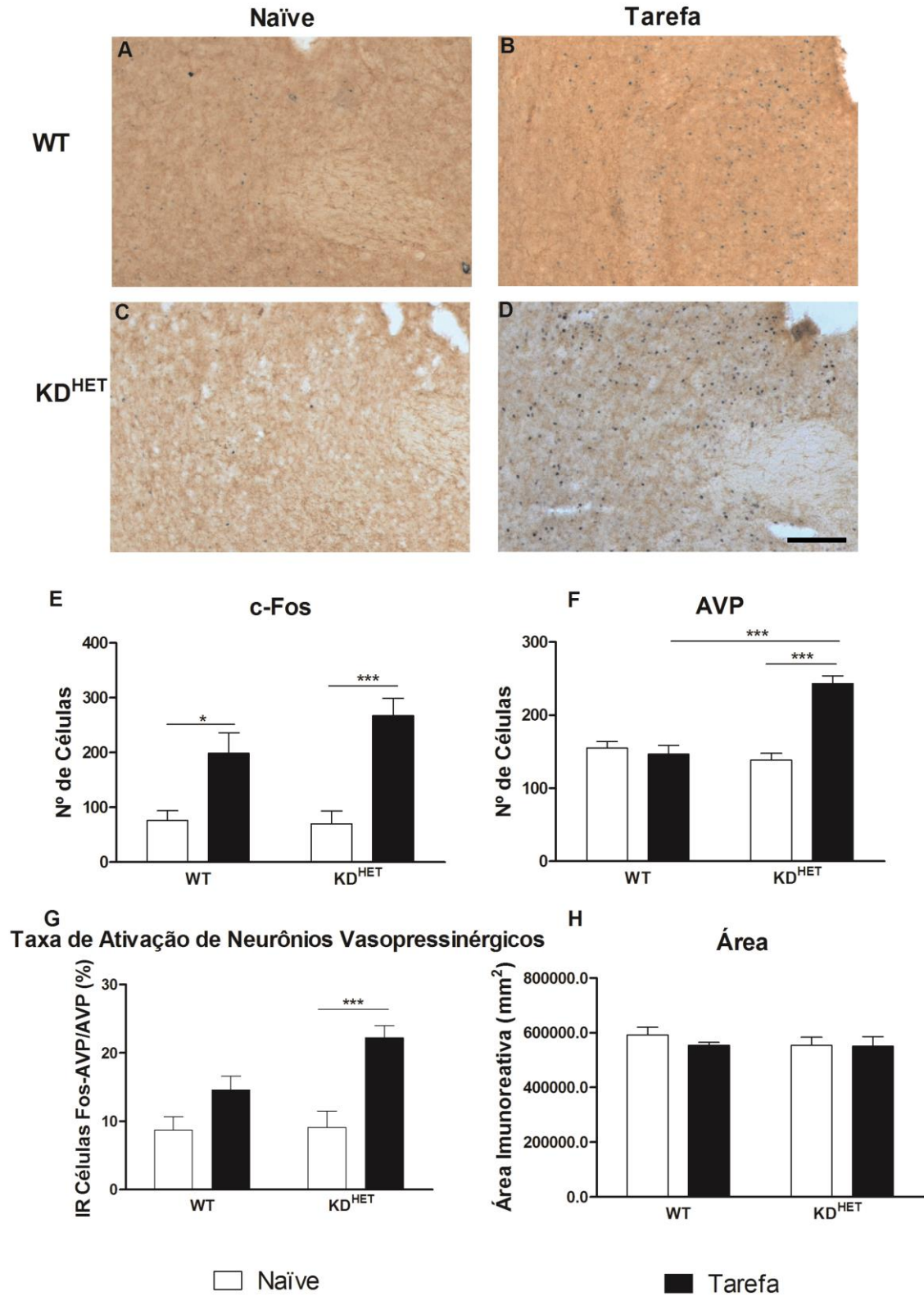
**Figura 31** Expressão de AVP e c-Fos no LH de camundongos VChT KD pós RI, pela técnica de imunohistoquímica. Em castanho neurônios AVP-positivos e em azul neurônios c-Fos positivos. De A-D imagens ilustrativas: WT Naive (A) e Tarefa (B); KD<sup>HET</sup> Naive (C) e Tarefa (D). Aumento de 10x. De G-H quantificação das imagens: número de células c-FOS positivas (E); número de células AVP positivas (F); taxa de neurônios vasopressinérgicos ativos (G); área quantificada (H). Barras representam a média ± o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica p<0,05; \*\* indica p<0,01; \*\*\* indica p<0,001. Resultados obtidos com camundongos WT Naive n=4 e Tarefa n=5; KD<sup>HET</sup> Naive n=6 e Tarefa n=7. ANOVA de 2 Vias.

Similar aos resultados vistos no PVN, o teste comportamental recrutou o AH, sendo que não houve diferença entre os genótipos na expressão de Fos (Interação:  $F_{(1,18)} = 0,7130$   $p = 0,4095$ ; Tarefa:  $F_{(1,18)} = 22,96$   $p < 0,0001$ ; Genótipo:  $F_{(1,18)} = 2,578$   $p = 0,1257$ ). Novamente, a tarefa elevou a expressão de vasopressina (Interação:  $F_{(1,18)} = 4,347$   $p = 0,0516$ ; Tarefa:  $F_{(1,18)} = 3,451$   $p = 0,0796$ ; Genótipo:  $F_{(1,18)} = 7,974$   $p = 0,012$ ) e a atividade de neurônios vasopressinérgicos (Interação:  $F_{(1,18)} = 3,241$   $p = 0,0886$ ; Tarefa:  $F_{(1,18)} = 29,29$   $p < 0,0001$ ; Genótipo:  $F_{(1,18)} = 12,62$   $p = 0,0023$ ) apenas nos animais heterozigotos, sendo essa expressão maior no grupo  $KD^{HET}$  tarefa que no WT tarefa. A área utilizada na quantificação não variou entre os grupos (Figura 32).



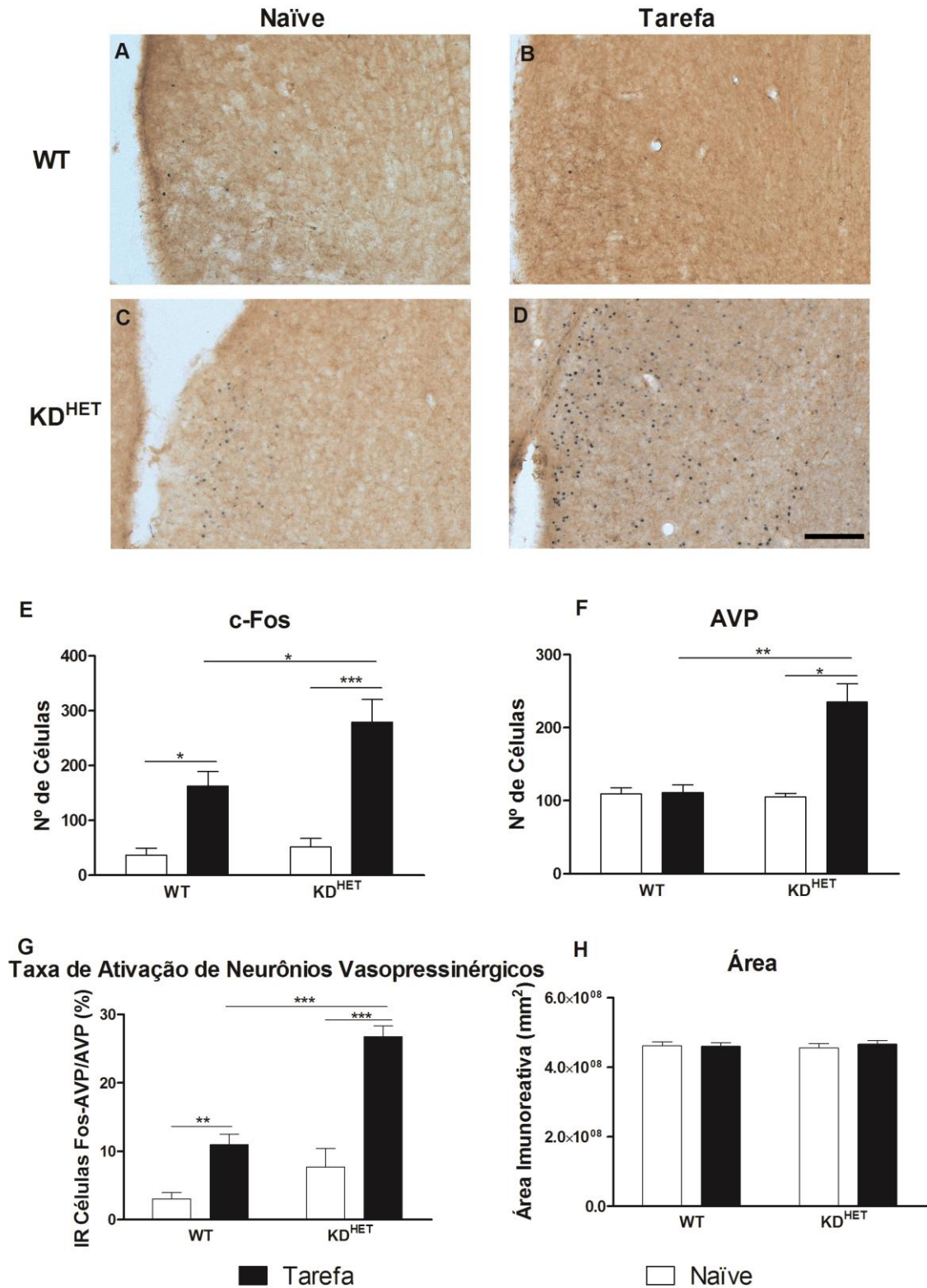
**Figura 32** Expressão de AVP e c-Fos no AH de camundongos VACHT KD pós tarefa de RI, pela técnica de imunohistoquímica. Em castanho neurônios AVP-positivos e em azul neurônios c-FOS positivos. De A-D imagens ilustrativas: WT Naive (A) e Tarefa (B); KD<sup>HET</sup> Naive (C) e Tarefa (D). Aumento de 10x. De G-H quantificação das imagens: número de células c-FOS positivas (E); número de células AVP positivas (F); taxa de neurônios vasopressinéricos ativos (G); área quantificada (H). Barras representam a média ± o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica p<0,05; \*\* indica p<0,01; \*\*\* indica p<0,001. Resultados obtidos com camundongos WT Naive n=4 e Tarefa n=5; KD<sup>HET</sup> Naive n=6 e Tarefa n=7. ANOVA de 2 Vias.

Semelhantemente ao PVN e ao AH, no BNST o RI gerou um aumento da expressão de Fos em ambos os genótipos, sem haver diferenças entre eles (Interação:  $F_{(1,17)} = 1,418$   $p=0,2550$ ; Tarefa:  $F_{(1,17)} = 25,70$   $p<0,0001$ ; Genótipo:  $F_{(1,17)} = 0,9752$   $p=0,3372$ ). Além disso, foi notado um aumento na expressão de vasopressina nos heterozigotos, sendo que o grupo  $KD^{HET}$  tarefa apresentou mais neurônios AVP que o grupo WT tarefa (Interação:  $F_{(1,17)} = 27,01$   $p<0,0001$ ; Tarefa:  $F_{(1,17)} = 19,56$   $p=0,0004$ ; Genótipo:  $F_{(1,17)} = 13,6$   $p=0,0018$ ). Já a atividade de neurônios vasopressinérgicos aumentou apenas no grupo heterozigoto em resposta ao RI (Interação:  $F_{(1,17)} = 3,175$   $p=0,0926$ ; Tarefa:  $F_{(1,17)} = 21,69$   $p=0,0002$ ; Genótipo:  $F_{(1,17)} = 3,834$   $p=0,0668$ ). Não houve diferença na área quantificada (Figura 33).



**Figura 33** Expressão de AVP c-Fos no BNST de camundongos VACHT KD pós tarefa de RI, pela técnica de imunohistoquímica. Em castanho neurônios AVP-positivos e em azul neurônios c-Fos positivos. De A-D imagens ilustrativas: WT Naïve (A) e Tarefa (B); KD<sup>HET</sup> Naïve (C) e Tarefa (D). Aumento de 10x. De G-H quantificação das imagens: número de células c-FOS positivas (E); número de células AVP positivas (F); taxa de neurônios vasopressinéricos ativos (G); área quantificada (H). Barras representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica  $p < 0,05$ ; \*\*\* indica  $p < 0,001$ . Resultados obtidos com camundongos WT Naïve  $n=5$  e Tarefa  $n=6$ ; KD<sup>HET</sup> Naïve  $n=4$  e Tarefa  $n=6$ . ANOVA de 2 Vias.

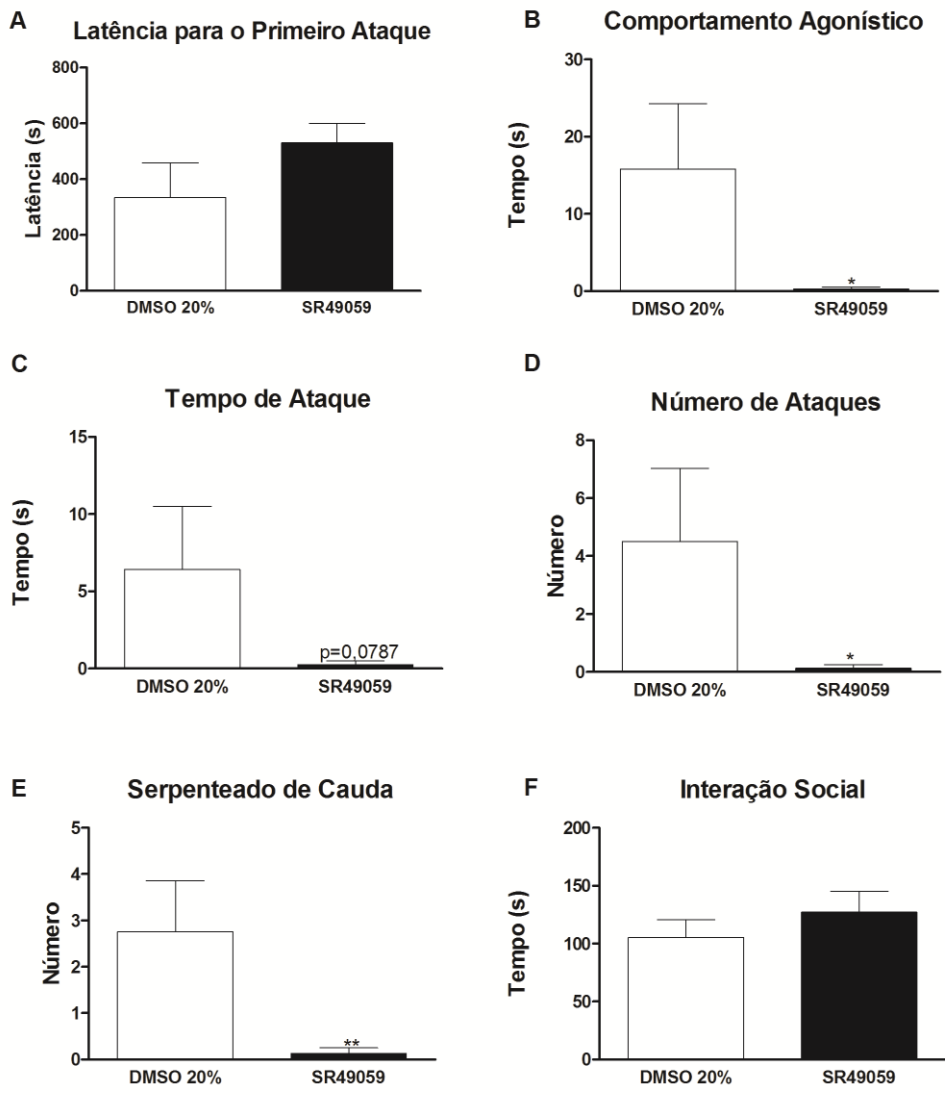
Finalmente, o LSv se comportou de modo análogo ao LH. A atividade neural aumentou em resposta ao RI, sendo maior em KD<sup>HET</sup> tarefa que nos WT tarefa (Interação:  $F_{(1,17)}= 2,870$   $p=0,1085$ ; Tarefa:  $F_{(1,17)}= 34,68$   $p<0,0001$ ; Genótipo:  $F_{(1,17)}= 4,734$   $p=0,044$ ). O número de neurônios vasopressina positivos aumentou em resposta a tarefa apenas nos heterozigotos, sendo que esse grupo apresentou mais neurônios AVP que os selvagens (Interação:  $F_{(1,17)}= 14,69$   $p=0,0013$ ; Tarefa:  $F_{(1,17)}= 15,41$   $p=0,0011$ ; Genótipo:  $F_{(1,17)}= 12,78$   $p=0,0023$ ). Ambos os genótipos aumentaram a atividade dos neurônios vasopressinérgicos durante o RI, sendo que o grupo KD<sup>HET</sup> apresentou uma atividade maior que seu respectivo controle (WT tarefa) (Interação:  $F_{(1,17)}= 10,65$   $p=0,0046$ ; Tarefa:  $F_{(1,17)}= 62,42$   $p<0,0001$ ; Genótipo:  $F_{(1,17)}= 35,87$   $p<0,0001$ ). A área utilizada na quantificação não diferiu entre os grupos (Figura 23).



**Figura 34** Expressão de AVP e c-Fos no LSv de camundongos VACHT KD pós tarefa de RI, pela técnica de imunohistoquímica. Em castanho neurônios AVP-positivos e em azul neurônios c-FOS positivos. De A-D imagens ilustrativas: WT Naïve (A) e Tarefa (B); KD<sup>HET</sup> Naïve (C) e Tarefa (D). Aumento de 10x. De G-H quantificação das imagens: número de células c-FOS positivas (E); número de células AVP positivas (F); taxa de neurônios vasopressinérgicos ativos (G); área quantificada (H). Barras representam a média ± o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica p<0,05; \*\* indica p<0,01; \*\*\* indica p<0,001. Resultados obtidos com camundongos WT Naïve n=4 e Tarefa n=5; KD<sup>HET</sup> Naïve n=6 e Tarefa n=6. ANOVA de 2 Vias.

### 7.15 Bloqueio dos receptores V1a no BNST diminui a agressividade de **KD<sup>HET</sup>**

O BNST foi infundido com antagonista V1aR (SR49059). Nossos resultados mostram que a infusão do antagonista reduz significativamente o tempo de comportamento agonístico ( $t_{(7)}=584,5$   $p=0,024$ ), número de ataques ( $t_{(7)}=205,3$   $p=0,0284$ ) e serpenteados de cauda ( $t_{(7)}=39,33$   $p=0,0064$ ). Não tendo efeito sob os demais parâmetros da agressividade nem sob a interação social não-agressiva. Vale ressaltar que há uma tendência em reduzir o tempo de ataque ( $F_{(4,3)}=168,6$   $p=0,0787$ ) (Figura 35).



**Figura 35** Teste de residente intruso 10 min após a infusão de SR49059 no BNST 20ng/μl. Latência para o primeiro ataque (A); Tempo de Comportamento Agonístico (B); Tempo de Ataque (C); Número de Ataques (D); Número de Serpenteados de Cauda (E); Tempo de Interação Social (F). Resultados obtidos com camundongos KD<sup>HET</sup> Veículo n=5 SR49059 n=8. Barras representam a média ± o erro padrão da média (E.P.M.). \* indica p < 0,05; \*\* indica p<0,01. Teste t.

## 7.16 Resumo dos resultados principais

**Tabela 1 Resumo dos resultados.** Tabela sumariza os resultados obtidos em todos os modelos utilizados nesse trabalho. Siglas: AVP (vasopressina), ChAT (colina acetiltransferase), + (aumento), - (redução), Ø (inalterado) e N.A. (não se aplica).

Modelo Animal	Agressividade	Interação Social	Locomoção	AVP	ChAT
VACHT KD	+	Ø	Ø	+	N.A.
Vesamicol Agudo	Ø	+	+	N.A.	N.A.
ChAT-ChR2-EYFP	-	+	Ø	N.A.	N.A.
Galantamina Agudo	Ø	-	-	N.A.	N.A.
Isolamento Social	+	-	Ø	N.A.	+

## 8 DISCUSSÃO

Nosso trabalho foi o primeiro a elucidar de forma sistemática o papel da acetilcolina no comportamento social de camundongos. Observamos que alterações do tônus colinérgico fazem com que o comportamento social oscile entre a agressão e a afiliação. Além disso, a gênese da agressividade observada parece advir da interação entre vasopressina e acetilcolina.

Inicialmente nós mostramos que animais modelo de hipofunção colinérgica (KDHE) apresentam um comportamento agressivo exacerbado, que é revertido após a administração de galantamina. É importante ressaltar que os resultados não são associados a um déficit na sociabilidade, nem a um aumento da impulsividade ou de dominância. Comprovando isso, vimos também que KDHE apresentam agressividade controlada e não anormal, já que esses animais não atacam intrusos vulneráveis, mas atacam em uma tarefa motivacional (FCT) (Cordero and Sandi 2007; Beiderbeck, Reber et al. 2012; Haller 2013).

A literatura ainda é dúbia sobre o papel da ACh na agressividade. Alguns trabalhos mostram que agonistas colinérgicos e inibidores da acetilcolinesterase amplificam esse comportamento (Bandler 1970; Winslow and Camacho 1995) enquanto outros mostram que agonistas específicos colinérgicos abolem a agressividade em roedores (Picciotto, Lewis et al. 2015). O trabalho de Bandler e colaboradores (1970) refere-se à agressão predatória e muricídio, em ratos, que apresenta substratos neurais diferentes da agressividade entre machos avaliada no nosso modelo (Comai, Tau et al. 2012; Haller 2013). Já Camacho e colaboradores (1995) avaliam a agressividade anormal contra uma fêmea OVX em uma tarefa de memória, com um forte componente aprendido, cujos

substratos também diferem da agressividade avaliada pelo nosso grupo (Haller 2013). Por outro lado, pesquisas utilizando a agressividade entre machos e o RI mostram que a infusão de nicotina reduz o comportamento agressivo, em camundongos e ratos, e esses efeitos são abolidos quando é utilizado um antagonista nAChR (mecamilamina) (Waldbillig 1980; Johnson, Carlson et al. 2003), corroborando nossos resultados.

Uma vez que os animais transgênicos utilizados no nosso trabalho apresentam uma redução crônica do tônus colinérgico durante o desenvolvimento, optamos por utilizar o vesamicol em camundongos C57BL/6, visando mimetizar a redução do tônus colinérgico observada nos VACHT KD, avaliando seu efeito sobre o comportamento social. Para isso, utilizamos duas doses de vesamicol 5 $\mu$ M, dose cujo efeito é bem caracterizado na junção neuromuscular (JNM) (Rodrigues, Fonseca Mde et al. 2013), e 10 $\mu$ M, maior dose em que o vesamicol não apresenta efeitos inespecíficos na JNM (Searl, Prior et al. 1991; Prior, Marshall et al. 1992). Surpreendentemente, nossos resultados mostram que a dose baixa não teve efeito sobre o comportamento motor e social de camundongos. Enquanto a dose alta gerou um aumento na exploração social do co-específico e no número de “rearings”. Camacho e colaboradores (1995) já haviam mostrado que o tratamento com escopolamina (antagonista muscarínico) aumenta a investigação olfativa no RI. Por outro lado, Lee e colaboradores (2014) mostraram que o comportamento social possui um controle escalável em camundongos, no VMHvl, de modo que o comportamento oscila entre o coito e agressão, tendo como fase intermediária um aumento da interação social. Tomando isso como referência nossa dose pode não ter recrutado todas as células do VMHvl necessárias para a expressão do comportamento agressivo.

Mais experimentos devem ser realizados utilizando doses maiores ou possivelmente um tratamento por períodos sub-crônicos, visando elucidar melhor o efeito do vesamicol sobre o comportamento social.

O resultado descrito acima mostra que as reduções, aguda e crônica, do tônus colinérgico modulam diferencialmente o comportamento social de camundongos. Isso pode ocorrer devido a alterações plásticas apresentadas pelos transgênicos, visando compensar a hipofunção colinérgica. De fato, a ACh atua no SNC modulando a excitabilidade neural, a liberação de neurotransmissores e coordenando a atividade de diferentes núcleos (Picciotto, Higley et al. 2012). Realmente, camundongos VACHT KD apresentam alterações no que tange a transmissão colinérgica. Animais  $KD^{HET}$  apresentam maiores níveis de ACh no PFC, estriado e HIP, por mecanismos que ainda não foram determinados (Prado, Martins-Silva et al. 2006).  $KD^{HOM}$  apresentam redução do número de vesículas sinápticas na junção neuromuscular, de modo que essas vesículas apresentam forma e tamanho irregular (Rodrigues, Fonseca Mde et al. 2013). Resultados não publicados do nosso grupo mostram ainda que fêmeas  $KD^{HOM}$  possuem níveis elevados de DA e 5-HT no cérebro, neurotransmissores responsáveis por modular respostas de agressão (Reis, M P et al. in press).

Tendo em vista as pesquisas citadas previamente e o fato da ACh ser um importante neurmodulador de circuitos neurais, decidimos avaliar o efeito da hipofunção colinérgica sobre o circuito da agressividade em camundongos VACHT KD. Para isso utilizamos a técnica de imunohistoquímica para marcação de c-Fos (marcador de atividade neural) e vasopressina. A AVP foi escolhida por ser amplamente reconhecida como um neuropeptídeo implicado na gênese da agressão (Wersinger, Ginns et al. 2002; Albers, Dean et al. 2006; Bosch and

Neumann 2010; Veenema, Beiderbeck et al. 2010) e por apresentar uma íntima relação com o sistema colinérgico (Maegawa, Katsube et al. 1992; Tanabe, Shishido et al. 1999; Xu, Torday et al. 2003; Shi, Mao et al. 2008; Wang, Yang et al. 2010; Wang, Ennis et al. 2015).

Neste experimento avaliamos estruturas (PVN, SON, LH, AH, BNST, LS) amplamente reconhecidas como essenciais para a gênese de comportamentos agressivos e que também sintetizam a AVP ou são alvo das suas ações na agressividade (Nelson and Trainor 2007; Caldwell, Lee et al. 2008; Haller 2013). Como esperado, todas as regiões foram recrutadas pela tarefa de RI. Embora apenas o hipotálamo lateral e o septo lateral ventral tenham apresentado maior expressão de c-Fos global nos KD<sup>HET</sup>, pós-tarefa. Já é vastamente conhecido na literatura, que essas regiões são recrutadas em resposta a agressividade (Newman 1999; Nelson and Trainor 2007) embora nosso trabalho tenha sido o primeiro a mostrar a ativação conjunta de todas as regiões mencionadas em camundongos. De Jong e colaboradores (2014) mostraram um aumento da expressão de ERK fosforilada na HAA, da qual o LH faz parte, após o teste do intruso em fêmeas. Enquanto, Veenema (2010) e colaboradores verificaram o papel indispensável do LS na gênese de agressividade, com experimentos de microdiálise, no RI.

Verificamos também que a expressão de vasopressina se elevou em todas as regiões avaliadas nos animais KD<sup>HET</sup> em resposta a tarefa. Sendo que esses animais apresentaram maior número de neurônios vasopressinérgicos do que camundongos WT, após a tarefa. O aumento na expressão da 106 vasopressina no hipotálamo, em resposta a um encontro agonístico, já é bem descrito na literatura.

Arganazes mandarins, machos e fêmeas, dominantes apresentam um aumento do comportamento agressivo quando comparados a animais submissos, de modo que após o RI ocorre um aumento no número de neurônios AVP no PVN, SON, LH e AH nesses animais, corroborando os nossos dados (Qiao, Yan et al. 2014). Já foi observado, em ratos, que a separação materna gera aumento da agressividade acompanhado de um aumento da expressão de AVP no PVN, SON e LH duas horas após a tarefa de RI, semelhantemente ao que observamos (Veenema, Blume et al. 2006). Quanto ao LS, já foi visto que ocorre um aumento na liberação de vasopressina durante o teste de RI, em ratos selecionados para um fenótipo de alta agressividade, de modo que esse comportamento é abolido pela infusão de antagonista V1a por retrodiálise (Veenema, Beiderbeck et al. 2010). Experimentos com *Peromyscus californicus*, um animal modelo de agressividade, mostraram que há uma correlação positiva entre o número de células AVP positivas no BNST caudal e o número de mordidas no RI (Steinman, Laredo et al. 2015).

Como já foi dito anteriormente, o sistema colinérgico interage fortemente com o vasopressinérgico. Vários trabalhos mostram projeções de neurônios colinérgicos para núcleos hipotalâmicos produtores de AVP (Xu, Torday et al. 2003) e interneurônios colinérgicos no hipotálamo (Wang, Ennis et al. 2015). De fato, experimentos com infusão de ácido quinolínico, no nbm de ratos, mostram que a morte dos neurônios colinérgicos desse núcleo é acompanhada por uma diminuição da expressão de vasopressina e do número de neurônios vasopressinérgicos no SCN (Madeira, Pereira et al. 2004). Aparentemente conflitante com nossos resultados, uma vez que observamos que a diminuição do tônus colinérgico resulta no aumento do número de neurônios

vasopressinérgicos no PVN, SON, AH, LH, BNST e LSv, em resposta a tarefa sem alteração em animais naïve. Entretanto, temos que ressaltar que o experimento de Madeira e colaboradores foi realizado com lesão em ratos, analisando-se apenas o SCN. Portanto, essa discrepância pode ser devido à diferença entre as espécies, especificidade da região cerebral ou a uma diferença da extensão da diminuição do tônus.

As análises da taxa de atividade de neurônios vasopressinérgicos mostraram um perfil semelhante ao da expressão da vasopressina. Em todos os núcleos avaliados a atividade de neurônios vasopressinérgicos foi aumentada pela tarefa, no SON e BNST, este aumento foi exclusivo em animais  $KD^{HET}$ . Os demais núcleos (PVN, LH, AH e LSv) dos animais  $KD^{HET}$  apresentaram maior atividade de neurônios AVP que os selvagens, após a tarefa. Dentro do grupo naïve, de forma interessante, os neurônios vasopressinérgicos do PVN, dos animais heterozigotos, apresentaram uma atividade elevada quando comparados aos animais selvagens, sendo essa diferença mantida após a tarefa. Experimentos com camundongos C57BL/6 isolados por 4 semanas mostram que esses animais ficam mais agressivos, elevando o número de mordidas e serpenteados de cauda e reduzindo a latência para o primeiro ataque. Além disso, esses animais aumentam a atividade de neurônios vasopressinérgicos no PVN, SON, BNST e MPOA, corroborando os nossos dados (Nadler, Moy et al. 2004).

Possivelmente o aumento concomitante de atividade de neurônios vasopressinérgicos e da expressão de vasopressina em todas as regiões amostradas represente uma interconexão entre essas áreas. De fato, os sistemas vasopressinérgicos do PVN e SON apresentam amplas conexões entre

si e deles com outras regiões hipotalâmicas como o LH e AH (De Vries and Buijs 1983; DeVries, Buijs et al. 1985), regiões efectoras de comportamentos agressivos (Haller 2013). O PVN apresenta projeções AVP, para o BNST, e este projeta para o LS (De Vries and Buijs 1983; DeVries, Buijs et al. 1985). Além disso, BNST e LH se interconectam via projeções vasopressinérgicas e não-vasopressinérgicas (Carrillo, Ricci et al. 2011).

Nossos resultados mostram que a atividade basal dos neurônios AVP se encontra aumentada apenas no PVN em  $KD^{HET}$ , isso é um indicativo de que esse núcleo dita a atividade do restante dos circuitos vasopressinérgicos. De fato, a vasopressina endógena modula sua própria secreção (somatodendrítica), provavelmente por vias parácrinas, vesículas de AVP contêm receptores V1a e V1b. No momento da secreção, esses receptores ficam expostos ao meio extracelular. Acredita-se que os receptores V1b estão envolvidos na atividade fásica e tem um efeito estimulatório sobre a secreção da vasopressina. Enquanto os receptores V1a apresentam um efeito inibitório sobre a secreção (Brown, Bains et al. 2013). Mais experimentos são necessários com antagonistas e agonistas específicos para elucidar esse circuito a partir dos resultados obtidos nesse trabalho.

Ainda corroborando nossos dados, neurônios vasopressinérgicos são responsivos a acetilcolina, uma vez que agonistas colinérgicos como o carbacol e a nicotina elevam a atividade de neurônios vasopressinérgicos e a secreção de vasopressina (Shi, Mao et al. 2008; Mikkelsen, Jacobsen et al. 2012). Além disso, a própria AVP aumenta a liberação de ACh no hipocampo (Maegawa, Katsube et al. 1992) e estriado (Wang, Yang et al. 2010) de roedores. Embora nosso animal apresente uma redução do tônus colinérgico, acreditamos

que ele seja mais responsivo a acetilcolina, isso pode ocorrer por variações na expressão dos receptores colinérgicos. De fato, nocautes para o VACHT apresentam maior número de receptores nicotínicos na JNM (de Castro, De Jaeger et al. 2009). Acreditamos que o sistema colinérgico age alterando a atividade dos neurônios vasopressinérgicos do PVN, os quais por sua vez, modulam a atividade dos neurônios AVP no restante da via da agressividade. Sendo assim, a diminuição da liberação de ACh pode levar a um aumento na secreção de AVP, uma vez que esse peptídeo compensa déficits colinérgicos (Fujiwara, Ohgami et al. 1997; Tanabe, Shishido et al. 1999). Mais experimentos são necessários para explicar o efeito da hipofunção colinérgica sobre a expressão e atividade de neurônios AVP, juntamente com seu efeito sobre a agressividade.

Uma vez que o BNST é o ponto de conexão entre estruturas hipotalâmicas como PVN e LH e de regiões telencefálicas como o LSv, envolvidas na agressividade, nós decidimos modular o tônus vasopressinérgico nessa região por meio da infusão de SR49059 (antagonista V1a) em KD<sup>HET</sup>. Além desse fato vários trabalhos mostram um aumento de atividade (c-Fos) e de marcadores de plasticidade (ERK) no BNST em resposta ao RI (Trainor, Crean et al. 2010; Wang, He et al. 2013).

Nossos resultados mostram que a infusão de antagonista de receptor V1a no BNST de KD<sup>HET</sup> diminui a agressividade desses animais. Trabalhos com animais selecionados para alto fenótipo agressivo já mostram que o bloqueio desses receptores no septo lateral, mas não no BNST reduz a expressão de comportamentos agressivos (Veenema, Beiderbeck et al. 2010). Além disso, nesse mesmo modelo em fêmeas lactantes o bloqueio dos receptores V1a, na

CeA, atenua a agressividade (Bosch and Neumann 2010). Albers e colaboradores (2006) mostraram também o aumento de expressão deste receptor em hamsters sírios isolados e com aumento do número e tempo de ataque.

O isolamento social de três semanas foi utilizado como um modelo para a indução do comportamento agressivo (Albers, Dean et al. 2006; Haller 2013; Wang, He et al. 2013). Nosso objetivo foi verificar se o tônus colinérgico estaria alterado em um modelo clássico de agressividade. Vimos que após três semanas, os níveis hipotalâmicos de ACh e Ch não estão alterados. Isso pode ser advindo da heterogeneidade do hipotálamo, essa região apresenta diversos núcleos com funções extremamente diferentes. Uma vez que apostamos que alteração colinérgica ocorre apenas no circuito hipotalâmico da agressividade, o fato de usarmos o hipotálamo total na análise pode ter gerado uma variação que não nos permitiu ver diferença entre os grupos.

Por outro lado, a expressão da ChAT encontra-se elevada no hipotálamo de animais isolados, principalmente em núcleos notoriamente envolvidos com agressividade como o AH e produtores de vasopressina como o PVN e SON. Experimentos com camundongos CD-1 isolados por 3 meses, mostram um aumento do número de neurônios ChAT positivos no nbm e no MS (Fiore, Amendola et al. 2003), corroborando nossos dados. Esse aumento da expressão de ChAT pode ser resultado de uma compensação devido há uma redução da atividade da enzima. Entretanto, experimentos com gerbils da mongolia isolados por 30 dias, um tempo semelhante ao nosso, mostram que esses animais apresentam um aumento da atividade da ChAT no hipotálamo (Yoshimura and Manabe 1981). Estes resultados em conjunto indicam uma provável redução dos níveis de ACh induzido pelo isolamento, gerando um aumento da expressão e

atividade da ChAT de forma compensatória. Isso poderia ser explicado por um aumento na expressão ou atividade da AChE ou uma redução na expressão de receptores pós-sinápticos nos nossos animais. De fato, o isolamento social aumenta a atividade da acetilcolinesterase no cérebro de roedores (Rosenzweig, Krech et al. 1962; Yoshimura and Manabe 1981). De forma similar aos nossos dados, a separação maternal por 24 horas, uma intervenção no contexto social, gera uma redução na atividade da AChE e aumento de fibras colinérgicas no hipocampo de ratos (Markovic, Radonjic et al. 2014).

Acreditamos que o aumento da ChAT pode surgir de forma compensatória à redução dos níveis de acetilcolina de uma maneira tempo dependente, em resposta a atividade ou expressão da AChE, isso provavelmente desencadearia as alterações na HAA. Portanto, seria necessário verificar os níveis de ACh em outros tempos (1 ou 2 semanas) para averiguar se eles se encontram alterados pelo isolamento. Estes experimentos poderiam ser associados a medidas de atividade da ChAT e da AChE no hipotálamo.

Em nível comportamental, o tratamento com galantamina reduz a agressividade induzida pelo isolamento social, isso indica que o aumento do tônus colinérgico pode bloquear as mudanças plásticas que originam a 112 agressão. Visto isso, optamos por isolar camundongos hipercolinérgicos. Observamos que o excesso de ACh impede o desenvolvimento do comportamento agressivo nesses animais, corroborando os dados farmacológicos. Confirmando nossos resultados, já foi demonstrado que agonistas colinérgicos, como a nicotina, reduzem o comportamento agressivo de roedores (Waldbillig 1980; Johnson, Carlson et al. 2003).

Nosso trabalho também avaliou os efeitos da hiperfunção colinérgica sobre o comportamento social de camundongos. De forma impressionante, um aumento do tônus colinérgico aumenta a afiliação em camundongos. Vale ressaltar, que o WT dessa linhagem não é sociável, entretanto o animal hipercolinérgico apresenta preferência tanto pelo estímulo social quanto pela novidade social. Uma vez que animais ChAT-ChR2-EYFP apresentam um aumento do tônus colinérgico crônico ao longo do desenvolvimento, optamos por ver o efeito do aumento agudo do tônus colinérgico através da galantamina. Esse experimento gerou uma redução do tempo de exploração social de camundongos. Provavelmente, isso remete ao fato desses animais apresentarem menor locomoção após a infusão da droga, uma vez que a sociabilidade não foi alterada, pois ambos os tratamentos preferem o estímulo social ao objeto e a novidade a familiaridade.

Pouco ainda se sabe sobre o papel do sistema colinérgico na afiliação. Já foi visto que a escopolamina diminuí o comportamento parental em camundongos machos, e que esse efeito é revertido pela fisostigmina, um inibidor da acetilcolinesterase (Fujimoto, Liu et al. 2013). Além disso, experimentos com modelos genéticos e farmacológicos de autismo, mostram que o tratamento sub-crônico com donepezil, um inibidor da acetilcolinesterase, 113 aumenta a sociabilidade desses animais, corroborando nossos resultados (Karvat and Kimchi 2014; Kim, Seung et al. 2014). Mais experimentos devem ser realizados para verificar o efeito da duração do aumento do tônus colinérgico no comportamento social em camundongos C57BL6/J.

Acreditamos que o sistema colinérgico estaria modulando o circuito da afiliação nestes animais. Já se sabe que a ocitocina, um importante

neurohormônio envolvido na afiliação (Insel 2010; Lukas, Toth et al. 2011; Stoop 2012), tem sua secreção modulada pela liberação de ACh. A nicotina aumenta a atividade de neurônios ocitocinérgicos no PVN e SON (Mikkelsen, Jacobsen et al. 2012). E o tratamento com carbacol, em fetos ovinos, aumenta a liberação de ocitocina sistêmica (Shi, Mao et al. 2008). Dessa forma, mais experimentos devem ser realizados para verificar a expressão de ocitocina e a atividade de neurônios ocitocinérgicos em camundongos ChAT-ChR2-EYFP, após o RI.

## **9 CONCLUSÃO**

Nosso trabalho mostrou que o sistema colinérgico regula o comportamento social de camundongos, sendo que alterações do tônus colinérgico levam a uma oscilação do comportamento social entre a afiliação e a agressividade. Comprovamos em um modelo genético de hipofunção colinérgica, que a agressividade é originada a partir da interação entre vasopressina e acetilcolina.

Sendo assim, o presente trabalho destacou a importância do sistema colinérgico sobre o comportamento social, sugerindo possíveis alvos para o tratamento de distúrbios de sociabilidade.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ago, Y., K. Koda, et al. (2011). "Pharmacological aspects of the acetylcholinesterase inhibitor galantamine." J Pharmacol Sci **116**(1): 6-17.
- Albers, H. E. (2012). "The regulation of social recognition, social communication and aggression: vasopressin in the social behavior neural network." Horm Behav **61**(3): 283-292.
- Albers, H. E., A. Dean, et al. (2006). "Role of V1a vasopressin receptors in the control of aggression in Syrian hamsters." Brain Res **1073-1074**: 425-430.
- Bandler, R. J., Jr. (1970). "Cholinergic synapses in the lateral hypothalamus for the control of predatory aggression in the rat." Brain Res **20**(3): 409-424.
- Barik, J., F. Marti, et al. (2013). "Chronic stress triggers social aversion via glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons." Science **339**(6117): 332-335.
- Beiderbeck, D. I., S. O. Reber, et al. (2012). "High and abnormal forms of aggression in rats with extremes in trait anxiety--involvement of the dopamine system in the nucleus accumbens." Psychoneuroendocrinology **37**(12): 1969-1980.
- Bielsky, I. F., S. B. Hu, et al. (2005). "The V1a vasopressin receptor is necessary and sufficient for normal social recognition: a gene replacement study." Neuron **47**(4): 503-513.
- Birnbaumer, M. (2000). "Vasopressin receptors." Trends Endocrinol Metab **11**(10): 406-410.
- Bosch, O. J. and I. D. Neumann (2010). "Vasopressin released within the central amygdala promotes maternal aggression." Eur J Neurosci **31**(5): 883-891.
- Brown, C. H., J. S. Bains, et al. (2013). "Physiological regulation of magnocellular neurosecretory cell activity: integration of intrinsic, local and afferent mechanisms." J Neuroendocrinol **25**(8): 678-710.
- Caldwell, H. K., H. J. Lee, et al. (2008). "Vasopressin: behavioral roles of an "original" neuropeptide." Prog Neurobiol **84**(1): 1-24.
- Carrillo, M., L. A. Ricci, et al. (2011). "Glutamate-vasopressin interactions and the neurobiology of anabolic steroid-induced offensive aggression." Neuroscience **185**: 85-96.
- Chaudhury, D., O. Escanilla, et al. (2009). "Bulbar acetylcholine enhances neural and perceptual odor discrimination." J Neurosci **29**(1): 52-60.
- Clarkson, E. D., B. A. Bahr, et al. (1993). "Classical noncholinergic neurotransmitters and the vesicular transport system for acetylcholine." J Neurochem **61**(1): 22-28.

- Comai, S., M. Tau, et al. (2012). "The psychopharmacology of aggressive behavior: a translational approach: part 1: neurobiology." J Clin Psychopharmacol **32**(1): 83-94.
- Cordero, M. I. and C. Sandi (2007). "Stress amplifies memory for social hierarchy." Front Neurosci **1**(1): 175-184.
- Cormier, H. C., V. Della-Maggiore, et al. (2015). "Suprachiasmatic vasopressin and the circadian regulation of voluntary locomotor behavior." Eur J Neurosci **41**(1): 79-88.
- de Castro, B. M., X. De Jaeger, et al. (2009). "The vesicular acetylcholine transporter is required for neuromuscular development and function." Mol Cell Biol **29**(19): 5238-5250.
- de Jong, T. R., D. I. Beiderbeck, et al. (2014). "Measuring virgin female aggression in the female intruder test (FIT): effects of oxytocin, estrous cycle, and anxiety." PLoS One **9**(3): e91701.
- De Vries, G. J. and R. M. Buijs (1983). "The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum." Brain Res **273**(2): 307-317.
- DeVries, G. J., R. M. Buijs, et al. (1985). "The vasopressinergic innervation of the brain in normal and castrated rats." J Comp Neurol **233**(2): 236-254.
- Dulac, C. and A. T. Torello (2003). "Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour." Nat Rev Neurosci **4**(7): 551-562.
- Everitt, B. J. and T. W. Robbins (1997). "Central cholinergic systems and cognition." Annu Rev Psychol **48**: 649-684.
- Ferreira-Vieira, T. H., C. P. Bastos, et al. (2014). "A role for the endocannabinoid system in exercise-induced spatial memory enhancement in mice." Hippocampus **24**(1): 79-88.
- Fiore, M., T. Amendola, et al. (2003). "Agonistic encounters in aged male mouse potentiate the expression of endogenous brain NGF and BDNF: possible implication for brain progenitor cells' activation." Eur J Neurosci **17**(7): 1455-1464.
- Fujimoto, H., H. X. Liu, et al. (2013). "Scopolamine modulates paternal parental retrieval behavior in mice induced by the maternal mate." Neurosci Lett **546**: 63-66.
- Fujiwara, M., Y. Ohgami, et al. (1997). "Effect of active fragments of arginine-vasopressin on the disturbance of spatial cognition in rats." Behav Brain Res **83**(1-2): 91-96.
- Goodson, J. L. (2005). "The vertebrate social behavior network: evolutionary themes and variations." Horm Behav **48**(1): 11-22.

- Guimaraes, I. M., T. G. Carvalho, et al. (2015). "The metabotropic glutamate receptor 5 role on motor behavior involves specific neural substrates." Mol Brain **8**(1): 24.
- Gunaydin, L. A., L. Grosenick, et al. (2014). "Natural neural projection dynamics underlying social behavior." Cell **157**(7): 1535-1551.
- Haller, J. (2013). "The neurobiology of abnormal manifestations of aggression--a review of hypothalamic mechanisms in cats, rodents, and humans." Brain Res Bull **93**: 97-109.
- Harrist, A., R. D. Beech, et al. (2004). "Alteration of hippocampal cell proliferation in mice lacking the beta 2 subunit of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor." Synapse **54**(4): 200-206.
- Insel, T. R. (2010). "The challenge of translation in social neuroscience: a review of oxytocin, vasopressin, and affiliative behavior." Neuron **65**(6): 768-779.
- Jasnic, N., J. Djordjevic, et al. (2013). "The effect of vasopressin 1b receptor (V1bR) blockade on HPA axis activity in rats exposed to acute heat stress." J Exp Biol **216**(Pt 12): 2302-2307.
- Johnson, S. K., K. M. Carlson, et al. (2003). "Effects of nicotine on target biting and resident-intruder attack." Life Sci **73**(3): 311-317.
- Karvat, G. and T. Kimchi (2014). "Acetylcholine elevation relieves cognitive rigidity and social deficiency in a mouse model of autism." Neuropsychopharmacology **39**(4): 831-840.
- Kim, J. W., H. Seung, et al. (2014). "Subchronic treatment of donepezil rescues impaired social, hyperactive, and stereotypic behavior in valproic acid-induced animal model of autism." PLoS One **9**(8): e104927.
- Kim, S. Y., A. Adhikari, et al. (2013). "Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety." Nature **496**(7444): 219-223.
- Kolisnyk, B., M. S. Guzman, et al. (2013). "ChAT-ChR2-EYFP mice have enhanced motor endurance but show deficits in attention and several additional cognitive domains." J Neurosci **33**(25): 10427-10438.
- Koshimizu, T. A., K. Nakamura, et al. (2012). "Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems." Physiol Rev **92**(4): 1813-1864.
- Kozorovitskiy, Y., M. Hughes, et al. (2006). "Fatherhood affects dendritic spines and vasopressin V1a receptors in the primate prefrontal cortex." Nat Neurosci **9**(9): 1094-1095.
- Lee, H., D. W. Kim, et al. (2014). "Scalable control of mounting and attack by Esr1+ neurons in the ventromedial hypothalamus." Nature **509**(7502): 627-632.

- Lesch, K. P., N. Araragi, et al. (2012). "Targeting brain serotonin synthesis: insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related to negative emotionality, aggression and antisocial behaviour." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **367**(1601): 2426-2443.
- Lin, D., M. P. Boyle, et al. (2011). "Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus." Nature **470**(7333): 221-226.
- Linster, C., P. A. Garcia, et al. (2001). "Selective loss of cholinergic neurons projecting to the olfactory system increases perceptual generalization between similar, but not dissimilar, odorants." Behav Neurosci **115**(4): 826-833.
- Lukas, M., I. Toth, et al. (2011). "The neuropeptide oxytocin facilitates pro-social behavior and prevents social avoidance in rats and mice." Neuropsychopharmacology **36**(11): 2159-2168.
- Madeira, M. D., P. A. Pereira, et al. (2004). "Basal forebrain neurons modulate the synthesis and expression of neuropeptides in the rat suprachiasmatic nucleus." Neuroscience **125**(4): 889-901.
- Maegawa, H., N. Katsube, et al. (1992). "Arginine-vasopressin fragment 4-9 stimulates the acetylcholine release in hippocampus of freely-moving rats." Life Sci **51**(4): 285-293.
- Markovic, B., N. V. Radonjic, et al. (2014). "Long-term effects of maternal deprivation on cholinergic system in rat brain." Biomed Res Int **2014**: 636574.
- McGraw, L. A. and L. J. Young (2010). "The prairie vole: an emerging model organism for understanding the social brain." Trends Neurosci **33**(2): 103-109.
- Mikkelsen, J. D., J. Jacobsen, et al. (2012). "Differential sensitivity to nicotine among hypothalamic magnocellular neurons." Endocr Regul **46**(1): 13-20.
- Mucignat-Caretta, C. (2010). "The rodent accessory olfactory system." J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol **196**(10): 767-777.
- Nadler, J. J., S. S. Moy, et al. (2004). "Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice." Genes Brain Behav **3**(5): 303-314.
- Nelson, R. J. and B. C. Trainor (2007). "Neural mechanisms of aggression." Nat Rev Neurosci **8**(7): 536-546.
- Newman, S. W. (1999). "The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network." Ann N Y Acad Sci **877**: 242-257.
- Paez-Gonzalez, P., B. Asrican, et al. (2014). "Identification of distinct ChAT(+) neurons and activity-dependent control of postnatal SVZ neurogenesis." Nat Neurosci **17**(7): 934-942.

- Pagani, J. H., M. Zhao, et al. (2015). "Role of the vasopressin 1b receptor in rodent aggressive behavior and synaptic plasticity in hippocampal area CA2." Mol Psychiatry **20**(4): 490-499.
- Pavesi, E., A. Gooch, et al. (2013). "Cholinergic modulation during acquisition of olfactory fear conditioning alters learning and stimulus generalization in mice." Learn Mem **20**(1): 6-10.
- Peters, S., D. A. Slattery, et al. (2014). "Dose-dependent effects of chronic central infusion of oxytocin on anxiety, oxytocin receptor binding and stress-related parameters in mice." Psychoneuroendocrinology **42**: 225-236.
- Picciotto, M. R., M. J. Higley, et al. (2012). "Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior." Neuron **76**(1): 116-129.
- Picciotto, M. R., A. S. Lewis, et al. (2015). "Mood and anxiety regulation by nicotinic acetylcholine receptors: A potential pathway to modulate aggression and related behavioral states." Neuropharmacology.
- Prado, V. F., C. Martins-Silva, et al. (2006). "Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition." Neuron **51**(5): 601-612.
- Prado, V. F., A. Roy, et al. (2013). "Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter." Biochem J **450**(2): 265-274.
- Prior, C., I. G. Marshall, et al. (1992). "The pharmacology of vesamicol: an inhibitor of the vesicular acetylcholine transporter." Gen Pharmacol **23**(6): 1017-1022.
- Qiao, X., Y. Yan, et al. (2014). "Sociality and oxytocin and vasopressin in the brain of male and female dominant and subordinate mandarin voles." J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol **200**(2): 149-159.
- Rand, J. B. (2007). "Acetylcholine." WormBook: 1-21.
- Ren, J., C. Qin, et al. (2011). "Habenula "cholinergic" neurons co-release glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes." Neuron **69**(3): 445-452.
- Rodrigues, H. A., C. Fonseca Mde, et al. (2013). "Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter and neurotransmitter content affects synaptic vesicle distribution and shape in mouse neuromuscular junction." PLoS One **8**(11): e78342.
- Rosenzweig, M. R., D. Krech, et al. (1962). "Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension." J Comp Physiol Psychol **55**: 429-437.

Searl, T., C. Prior, et al. (1991). "Acetylcholine recycling and release at rat motor nerve terminals studied using (-)-vesamicol and troxpyrrolium." J Physiol **444**: 99-116.

Shahar-Gold, H., R. Gur, et al. (2013). "Rapid and reversible impairments of short- and long-term social recognition memory are caused by acute isolation of adult rats via distinct mechanisms." PLoS One **8**(5): e65085.

Shi, L., C. Mao, et al. (2008). "Central cholinergic signal-mediated neuroendocrine regulation of vasopressin and oxytocin in ovine fetuses." BMC Dev Biol **8**: 95.

Sokolowski, M. B. (2010). "Social interactions in "simple" model systems." Neuron **65**(6): 780-794.

Steinman, M. Q., S. A. Laredo, et al. (2015). "Hypothalamic vasopressin systems are more sensitive to the long term effects of social defeat in males versus females." Psychoneuroendocrinology **51**: 122-134.

Stoop, R. (2012). "Neuromodulation by oxytocin and vasopressin." Neuron **76**(1): 142-159.

Stowers, L. and T. F. Marton (2005). "What is a pheromone? Mammalian pheromones reconsidered." Neuron **46**(5): 699-702.

Tanabe, S., Y. Shishido, et al. (1999). "Effects of arginine-vasopressin fragment 4-9 on rodent cholinergic systems." Pharmacol Biochem Behav **63**(4): 549-553.

Tobin, V. A., H. Hashimoto, et al. (2010). "An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition." Nature **464**(7287): 413-417.

Trainor, B. C., K. K. Crean, et al. (2010). "Activation of extracellular signal-regulated kinases in social behavior circuits during resident-intruder aggression tests." Neuroscience **165**(2): 325-336.

Trainor, B. C., S. Lin, et al. (2007). "Photoperiod reverses the effects of estrogens on male aggression via genomic and nongenomic pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(23): 9840-9845.

Van der Kloot, W. (2003). "Loading and recycling of synaptic vesicles in the Torpedo electric organ and the vertebrate neuromuscular junction." Prog Neurobiol **71**(4): 269-303.

Van Schalkwyk, G. I., A. S. Lewis, et al. (2015). "Reduction of Aggressive Episodes After Repeated Transdermal Nicotine Administration in a Hospitalized Adolescent with Autism Spectrum Disorder." J Autism Dev Disord.

Veenema, A. H., D. I. Beiderbeck, et al. (2010). "Distinct correlations of vasopressin release within the lateral septum and the bed nucleus of the stria terminalis with the display of intermale aggression." Horm Behav **58**(2): 273-281.

- Veenema, A. H., A. Blume, et al. (2006). "Effects of early life stress on adult male aggression and hypothalamic vasopressin and serotonin." Eur J Neurosci **24**(6): 1711-1720.
- Waldbillig, R. J. (1980). "Suppressive effects of intraperitoneal and intraventricular injections of nicotine on muricide and shock-induced attack on conspecifics." Pharmacol Biochem Behav **12**(4): 619-623.
- Wang, D. X., J. Yang, et al. (2010). "Arginine vasopressin induces rat caudate nucleus releasing acetylcholine to participate in pain modulation." Peptides **31**(4): 701-705.
- Wang, L., M. Ennis, et al. (2015). "Characteristics of GABAergic and cholinergic neurons in perinuclear zone of mouse supraoptic nucleus." J Neurophysiol **113**(3): 754-767.
- Wang, Y., Z. He, et al. (2013). "Medial amygdala lesions modify aggressive behavior and immediate early gene expression in oxytocin and vasopressin neurons during intermale exposure." Behav Brain Res **245**: 42-49.
- Wersinger, S. R., E. I. Ginns, et al. (2002). "Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice." Mol Psychiatry **7**(9): 975-984.
- Winslow, J. T. and F. Camacho (1995). "Cholinergic modulation of a decrement in social investigation following repeated contacts between mice." Psychopharmacology (Berl) **121**(2): 164-172.
- Xu, Z., J. Torday, et al. (2003). "Functional and anatomic relationship between cholinergic neurons in the median preoptic nucleus and the supraoptic cells." Brain Res **964**(2): 171-178.
- Yang, C. F., M. C. Chiang, et al. (2013). "Sexually dimorphic neurons in the ventromedial hypothalamus govern mating in both sexes and aggression in males." Cell **153**(4): 896-909.
- Yoshimura, H. and K. Manabe (1981). "Effects of later housing on both scent marking behavior and brain cholinergic activities in Mongolian gerbils." Experientia **37**(2): 163-164.
- You, I. J., Y. H. Jung, et al. (2012). "Alterations in the emotional and memory behavioral phenotypes of transient receptor potential vanilloid type 1-deficient mice are mediated by changes in expression of 5-HT(1)A, GABA(A), and NMDA receptors." Neuropharmacology **62**(2): 1034-1043.
- Zhao, S., J. T. Ting, et al. (2011). "Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function." Nat Methods **8**(9): 745-752.