

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

**Matheus Barbosa dos Santos**

**EFEITO DA VALÊNCIA DO ESTÍMULO SOCIAL NA PERSISTÊNCIA DA  
MEMÓRIA CONTEXTUAL**

BELO HORIZONTE

2018

# **EFEITO DA VALÊNCIA DO ESTÍMULO SOCIAL NA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA CONTEXTUAL**

**Matheus Barbosa dos Santos**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dr. Grace Schenatto Pereira Moraes

Agências financiadoras: CAPES, FAPEMIG, CNPq

BELO HORIZONTE

2018

## LISTA DE ABREVIATURAS

AOB	Bulbo Olfatório Acessório
AON	Núcleo Olfatório Anterior
AOS	Sistema Olfatório Acessório
BLA	Amígdala Basolateral
BNSTpl	Núcleo do leito da estria terminal posterolateral
BNSTpm	Núcleo do leito da estria terminal posteromedial
CeA	Amígdala Central
CoApl	Amígdala Cortical posterolateral
CoApm	Amígdala Cortical posteromedial
CPA	Aversão Condicionada ao Lugar
CPP	Preferência Condicionada ao Lugar
CTF	Campo tegumental central
EC	Córtex Entorrinal
GG	Gânglio de Grunemberg
H	Hipotálamo
Hipv	Hipocampo ventral
IF	Interação com a fêmea
IU	Interação com a urina de fêmea
LA	Porção lateral da amígdala cortical
MeA	Amígdala Medial
MOB	Bulbo Olfatório Principal
MOS	Sistema Olfatório Principal
MPA	Área preoptica media
MTN	Núcleos talâmicos da linha média
NAc	Núcleo accumbens
NRM	Núcleo da rafe magnus
NRP	Núcleo da rafe pallidus

OT	Tubérculo Olfativo
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PB	Núcleo parabrancual
PC	Córtex Piriforme
PMD	Núcleo dorasal pré-mamilar
PNC	Tegumento pontine caudal
PTN	Núcleos talâmicos intralaminar posterior
SD	Derrota Social
SDHM	Sistema Defensivo do Hipotálamo Medial
TMT	2,4,5-trimetil-3-triazolina
VA	Amígdala Vomeronasal
VMHvl	Hipotálamo Ventromedial ventrolateral
VTA	Área tegumental ventral

*Dedico essa dissertação a todas as pessoas que persistem no seu sonho e tentam chegar em um lugar melhor.*

O homem não me define,  
Minha casa não me define,  
Minha carne não me define,  
Eu sou o meu próprio lar.  
Francisco, el hombre.

## *Agradecimentos*

Eu gostaria de agradecer primeiramente a minha mãe que foi uma pessoa que me ajudou muito nesses anos que passei em Belo Horizonte, como também não posso deixar de agradecer a toda minha família pelo suporte da escolha de mudar de estado.

Gostaria de agradecer aos meus amigos de João Pessoa (todos eles) por me proporcionar momentos muito felizes quando saía dessa selva de pedra chamada BH.

Gostaria de agradecer aos meus amigos de Belo Horizonte (todos eles) por me fazerem sentir um pouco mais à vontade nesse ambiente que é tão diferente do que eu vim. Gostaria de agradecer principalmente a os meus amigos do laboratório (Lucianas (as duas), Thais, Laura, Lara, Caio, Larissa e ao Léo que me ajudou muito com o meu projeto e todos aqueles que não citei), aos meus amigos que passaram um tempo comigo nessa trajetória (César, Diana, Binho, Samir, Lucas, Jefferson, André, Higor) e por fim aqueles que foram muito importante pra mim aqui que são a Walma, pessoa chata que me conquistou e a Laila a pessoa que eu escolhi pra morar ultimamente. E não posso deixar de agradecer ao meu ex namorado (Lucas) que foi uma pessoa que estava ao meu lado em muitos momentos difíceis dessa dissertação

Quero agradecer do fundo do meu coração a minha orientadora, Grace, que me acolheu, uma pessoa que ela nunca viu na vida, que nunca tinha ouvido falar do meu nome e nem quem eu era, sei que tivemos nossas desavenças, mas quero que ela saiba que eu aprendi muita coisa nesses anos no laboratório dela. Também quero agradecer aos outros professores que estavam presentes nos momentos de descontração e aprendizado (Cleiton, Bruno, André, Marcio e Juliana)

Agradeço as agências de fomento (CAPES, CNPq e FAPEMIG) pela ajuda financeira e também agradeço a toda equipe da UFMG (secretaria, pessoal da limpeza, seguranças) por me proporcionar um ambiente ótimo para trabalhar.

## Lista de Figuras

Figura 1 Sistema olfatório de roedores.....	12
Figura 2 Circuitos neurais que participam em diferentes fases dos comportamentos sexuais e agressivos em roedores.....	13
Figura 3 Processamento do TMT.....	14
Figura 4 Circuitos hipotéticos para memorização do medo para diferentes tipos de ameaça.....	17
Figura 5 Escolha não forçada vs. escolha forçada.....	25
Figura 6 Memória contextual induzida pelo TMT testada 24h após o condicionamento.....	31
Figura 7 Memória contextual induzida pelo TMT testada 7 dias após o condicionamento.....	32
Figura 8 Comportamentos durante o condicionamento com o TMT.....	34
Figura 9 Memória contextual induzida pela urina de fêmea no proestro testada 24h após o condicionamento.....	36
Figura 10 Memória contextual induzida pela urina de fêmea no proestro testada 7 dias após o condicionamento.....	36
Figura 11 Comportamentos durante o condicionamento com a urina de fêmea no proestro.....	37
Figura 12 Memória contextual induzida pela derrota social testada 24h após o condicionamento.....	38
Figura 13 Memória contextual induzida pela derrota social testada 7 dias após o condicionamento.....	39
Figura 14 Comportamentos durante o condicionamento com a derrota social.....	40

Figura 15 Memória contextual induzida pela interação com a fêmea testada 24h após o condicionamento.....	42
Figura 16 Memória contextual induzida pela interação com a fêmea testada 7 dias após o condicionamento.....	42
Figura 17: Comportamentos durante o condicionamento com a interação com a fêmea.....	42

# Sumário

<b>1. Resumo</b> .....	7
<b>2. Abstract</b> .....	8
<b>3. Introdução</b> .....	9
3.1. Memória.....	15
3.1.1. Memória de medo condicionado versus inato.....	16
3.1.2 Memória condicionada ao lugar.....	19
3.2 Relações ecológicas.....	9
3.2.1 Predação.....	9
3.2.2 Competição.....	10
3.2.3 Interação Social.....	10
3.3. Sistema olfatório e processamento de odores.....	11
3.4 Valência de memória.....	20
<b>4. Objetivos</b> .....	23
4.1. Objetivo geral.....	23
4.2 Objetivos específicos.....	23
<b>5. Justificativa</b> .....	24
<b>6. Matérias e métodos</b> .....	25
6.1. Animais.....	25
6.2. Paradigma de condicionamento ao lugar.....	25
6.2.1. TMT como estímulo condicionado.....	27
6.2.2. Competição como estímulo condicionado.....	27
6.2.3 Interação sexual como estímulo condicionado.....	27
6.2.4 Urina da fêmea como estímulo condicionado.....	28
6.3. Comportamentos.....	29
6.3.1. Contexto positivo.....	29
6.3.1.1. Exposição ao TMT.....	29
6.3.1.2 Exposição ao CD1.....	29
6.3.2. Contexto negativo.....	29
6.3.2.1. Interação com a fêmea.....	29
6.3.2.2. Urina da fêmea.....	29
6.4. Análise estatística.....	30
<b>7. Resultados</b> .....	31

7.1. Uso do TMT no paradigma de aversão condicionada ao lugar forma memória contextual de valência negativa.....	31
7.2. Exposição repetida ao TMT aumenta comportamentos relacionados à ansiedade e medo.....	32
7.3. Preferência condicionada ao lugar com urina de fêmea em proestro forma memória contextual de valência positiva.....	34
7.4. Machos alteram a intensidade com que exploram a urina de fêmeas em proestro durante as sessões de condicionamento.....	36
7.5. Derrota social não induz memória contextual de valência negativa no paradigma de aversão condicionada ao lugar.....	37
7.6. Comportamentos relacionados à agressividade durante o condicionamento pela derrota social.....	39
7.7. Interação social com fêmea não induz memória contextual de valência positiva no paradigma de preferência condicionada ao lugar.....	40
7.8. Comportamentos relacionados à interação com a fêmea durante o condicionamento.....	41
<b>8. Discussão.....</b>	<b>43</b>
<b>9. Conclusão.....</b>	<b>48</b>
<b>10. Referências bibliográficas .....</b>	<b>49</b>

## 1. Resumo

As bases neurobiológicas de memórias contextuais provêm de paradigmas envolvendo estímulo negativo, como um choque. Entretanto, memórias de um mesmo contexto podem representar experiências positivas, e não apenas negativas. Com isso, se faz necessário entender como estímulos diferentes com valências opostas funcionam nesse paradigma. Utilizamos o paradigma adaptado do protocolo de condicionamento de aversão ou preferência ao lugar. Como estímulos sociais foram usados o TMT e a urina de fêmea no proestro, derrota social e interação com a fêmea. Todos são estímulos que estão envolvidos com a sobrevivência do animal e são equiparáveis. Também foram analisados alguns comportamentos durante o condicionamento, como por exemplo, o freezing no TMT, interação com a urina da fêmea, perseguição pelo CD1 agressivo e interação com a fêmea. Observamos que os estímulos olfatórios foram capazes de induzir memória contextual que persistiu por 7 dias após o condicionamento. O TMT foi capaz de induzir comportamentos do tipo ansioso e de medo e a urina da fêmea foi capaz de induzir uma maior exploração do macho por esse estímulo. Contudo, os estímulos polimodais, derrota social e interação com a fêmea, não foram capazes de induzir a formação da memória contextual e não encontramos relação entre o índice de escolha dos animais e os comportamentos durante o condicionamento. Assim, concluímos com os nossos resultados que é possível condicionar os animais e induzir a formação de uma memória contextual utilizando estímulos com valências opostas e essa memória se tornar de longa duração.

**Palavras-chave:** valência, estímulos sociais, condicionamento ao lugar, memória contextual, persistência.

## 2. Abstract

The neurobiological bases of contextual memories come from paradigms involving negative stimuli, such as shock. However, memories of the same context can represent positive experiences, not just negative experiences. So, it is necessary to understand how different stimuli with opposite valences work in this paradigm. We used the paradigm adapted from the protocol of aversion or preference conditioning place. TMT and female urine in proestrus, social defeat and interaction with female were used as social stimuli. All are stimuli that are involved with the survival of the animal and are comparable. We also analyzed some behaviors during conditioning, such as freezing in TMT, interaction with female urine, aggressive CD1 chase and female interaction. We observed that olfactory stimuli were able to induce contextual memory that persisted for 7 days after conditioning. TMT was able to induce anxious and fear-like behaviors. Female urine was able to induce further male exploration by this stimulus. However, the polymodal stimuli, social defeat and interaction with the female, were not able to induce the formation of the contextual memory. We did not find relationship between the index of choice of the animals and the behaviors during the conditioning. We can conclude from our results that it is possible to condition the animals and to induce the formation of a contextual memory using stimuli with opposing valences and this memory becomes of long duration.

**Key-words:** valence, social stimuli, conditioning to the place, contextual memory, persistence

### 3. Introdução

#### 3.1 Memória

A memória é estudada por diversas áreas do conhecimento, como a psicologia, antropologia, biologia, entre outros. Cada área possui seu foco, mas todas têm em comum o reconhecimento da importância dessa propriedade emergente do cérebro. Memórias constituem a essência do que caracteriza um indivíduo. Em outras palavras, os arquivos de memória gerados por experiências que vivemos durante a nossa vida moldam a nossa personalidade, os nossos sentimentos e guiam as nossas decisões (James, 1890). Segundo o dicionário Michaelis memória é a faculdade de lembrar e conservar ideias, imagens, impressões, conhecimentos e experiências. Para as ciências sociais a memória é coletiva, ou seja, à lembrança de um grupo que vive acontecimentos em comum. Para a psicologia memória pode ser definida como o que nos permite a aprendizagem, como também é a função mental que permite reter a informação. A capacidade de adquirir, armazenar e recuperar informações. Contudo, a definição de memória não é unânime, podendo ser definida de diversas formas.

A formação de memórias pode ser separada em etapas, que diferem entre si quanto ao aspecto celular e molecular: aquisição, consolidação, evocação e extinção/esquecimento.

A **aquisição** ocorre principalmente pelos sistemas sensoriais. Após o processamento primário, as informações do ambiente serão armazenadas, num processo denominado **consolidação**. A ideia mais aceita para o armazenamento é de que memórias são consolidadas sob a forma de engramas. Para memórias hipocampo-dependentes, esse engrama se forma inicialmente pela interação hipocampo-entorrinal. Já o armazenamento duradouro, parece depender de regiões do neocórtex (KITAMURA et al., 2017). Para que ocorra a consolidação de memórias são necessárias mudanças moleculares e estruturais, ou seja, mudança na formação de sinapses, chamadas de plasticidade neural (HEBB, 1949). A **evocação** é o que podemos chamar de “lembrar”, e é o momento onde um engrama consolidado é

reativado. Por fim temos a **extinção** e o **esquecimento** que são processos que modificam ou apagam as memórias existentes, respectivamente. Na extinção há a formação de uma nova memória, enquanto no esquecimento, acredita-se que ocorra um processo ativo que acarreta na eliminação de um determinado traço de memória (MYERS & DAVIS, 2007).

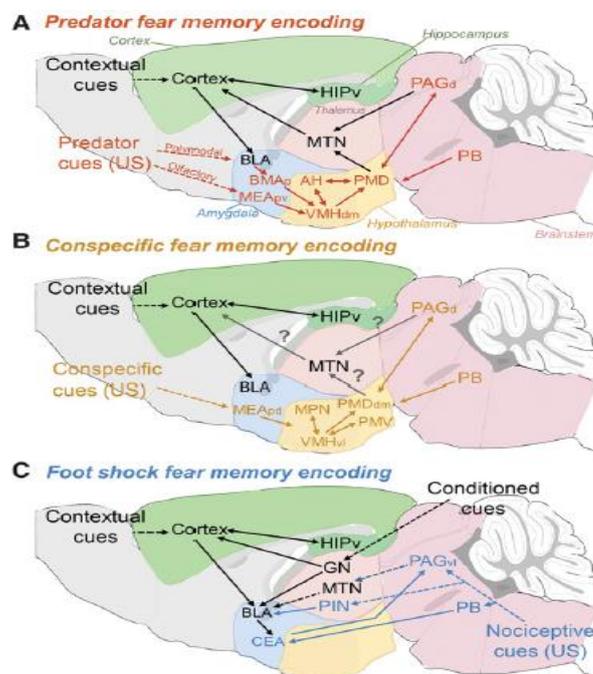
O aprendizado é a capacidade de retermos essas memórias, as evocarmos e por meio desta lembrança influenciar tomada de decisões e comportamentos subsequentes. Aprendizados abrangem novas representações neurais de (1) configurações espaciais do ambiente, (2) informações sensoriais que incluem características visuais, olfativas, gustativas e táteis, (3) padrões motores, como por exemplo, a sequência de movimentos corporais envolvidas na manipulação de um novo alimento, e até mesmo (4) a associação entre estímulo e ambiente (DUKAS, 2008).

### **3.1.1. Memória de medo condicionado *versus* medo inato**

O paradigma comportamental mais utilizado para a investigação das bases neurofisiológicas da memória é o condicionamento clássico. Brevemente, quando um camundongo, por exemplo, é exposto a um contexto e um som inócuo é tocado (estímulo condicionado), seguido de um choque nas patas (estímulo incondicionado), o animal exibe alterações fisiológicas e comportamentais de medo. Se num segundo momento esse mesmo animal for re-exposto ao contexto (memória de medo contextual) ou ao som (memória de medo auditiva) espera-se que ele exiba respostas comportamentais de medo, caso ele lembre que o som ou contexto antecede o choque. Usando esse paradigma, vários grupos de pesquisa mostraram que o hipocampo e a amígdala são áreas do cérebro essenciais para o processamento desta memória (CHAU et al., 2013; HEINRICHS et al., 2015; JIANG et al., 2017; MISANE et al., 2013; VERMA et al., 2015). Além disso, vias de sinalização dependentes da ativação de receptores glutamatérgicos (SACHSER et al, 2016), bem como síntese de novas proteínas (MORRIS & FREY, 1997; LEAL, et al, 2015), constituem alguns dos inúmeros marcadores moleculares da formação de memórias de medo de longo prazo.

Tinha-se que a amígdala era o centro de integração de todas as respostas ao medo, porém essa teoria vem sendo substituída, pois, dependendo do estímulo aversivos, a integração das informações ao medo ocorre em áreas distintas. A amígdala é uma das regiões mais importantes para a integração da informação sobre o medo, porém, essa região é mais importante para um estímulo aversivo como choque nas patas. Por exemplo, em se tratando de um estímulo aversivo, como um co-específico violento ou um predador, a circuitaria muda, salientando-se o hipotálamo medial mais do que a amígdala (SILVA et al, 2016).

A resposta ao estímulo aversivo do predador depende do sistema defensivo do hipotálamo medial. Esse sistema é composto pelo núcleo do hipotálamo anterior, porção ventromedial do hipotálamo ventromedial e o núcleo dorsal pré-mamilar (CANTERAS, 2002). Essas regiões recebem inputs de 2 regiões amigdalares, os núcleos mediais que possui conexão com o órgão vomeronasal, e os núcleos basomediais que recebe informações polimodais sobre o predador, incluindo a amigdala basolateral (BLA), que recebe informações dos córtices olfatório, insular e pré-frontal (SILVA et al, 2016).



**Figura 4:** Circuitos hipotéticos para a memorização do medo para diferentes tipos de ameaça. Os circuitos do medo inato para as diferentes ameaças interagem com áreas em comum, como a amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal (linhas pretas). **(A)** a memorização do medo ao predador depende das informações sobre o predador (US inputs: linhas laranja) sejam transmitidas ao hipotálamo, através da amígdala. O Sistema defensivo do hipotálamo medial (SDHM) recebe aferências do núcleo parabrânquial (PB). O SDHM é composto pelo núcleo anterior (AH), a porção dorsomedial do hipotálamo ventromedial (VMHdm) e o núcleo dorsal pré-mamilar (PMD) que integram a informação sensorial e levam às respostas defensivas para a porção dorsal da substância cinzenta periaquedutal (PAGd). O SDHM e a PAGd mandam projeções para os núcleos talâmicos da linha medial (MTN), que inclui o núcleo talâmico anteromedial que manda projeções para as estruturas corticais, tais quais, os córtices cingulado anterior, retrosplenial, entorrinal e perirrinal. **(B)** a memorização do coespecífico violento não foi totalmente elucidada, essas vias são especulativas, a informação do coespecífico violento (US inputs: linhas amarelas) convergem para o hipotálamo através da MeApd. Os núcleos hipotalâmicos são formados pela área preoptica medial (MPO), porção ventrolateral do hipotálamo ventromedial (VMHvl), núcleo premamilar ventral (PMV), a porção dorsomedial do núcleo premamilar dorsal (PMDdm) e manda projeções para PAGd. A memória do coespecífico violento é formada de forma semelhante à do predador. **(C)** a informação contextual (CS) que possui seus inputs que passam pela região cortico-talâmico para a amígdala basolateral (BLA) e hipocampo ventral (HIPv). A informação nociceptiva (US inputs: linha azul), uma das possíveis formas que os inputs chegam no sistema de memorização é através de um trato espino-talâmico que converge os inputs nociceptivos para a BLA e outras regiões corticais através dos núcleos talâmicos intralaminar posterior (PIN).

Uma maneira muito utilizada para condicionar animais é o TMT (2,3,5-trimetil-3-tiazolina), que é uma substância sintetizada a partir da glândula anal da raposa, que é um predador natural de roedores. Logo, o TMT é a ferramenta ideal para o estudo do medo inato ao predador (CRUMP, 1980; VERNET-MAURY, 1980). Odores de predadores que são derivados de secreções corporais (como por exemplo, urina e fezes) são chamados de kairomones. Estas substâncias acabam por oferecer uma vantagem às presas, já que as alerta sobre a presença ou proximidade do predador (ROSEN *et al*, 2015). O TMT é volátil, insolúvel em água e contém enxofre, que é um elemento presente nas fezes de carnívoros, derivado da digestão da carne (NOLTE *et al*, 1994).

Apesar da resposta comportamental ser a mesma – congelamento - o processamento de estímulos aversivos, especialmente TMT e choque nas

patas, parece recrutar a amígdala diferentemente. O papel da amígdala basolateral no condicionamento, utilizando como estímulo incondicionado o choque nas patas é bem conhecido (WAHLSTROM et al, 2018; BURGOS-ROBLES et al, 2017; GRUENE et al, 2016). Porém, em se tratando de medo inato, a amígdala cortical parece ser o alvo preferencial. Root e colaboradores (2014); utilizando ferramentas modernas, dentre elas a optogenética, demonstraram o papel da amígdala cortical no comportamento em resposta a odores inatos, tanto aversivos quanto apetitivos. Em outras palavras, a inibição das projeções do bulbo olfatório principal para a amígdala cortical preveniu a expressão de comportamentos aversivos e apetitivos na presença de TMT e 2-feniletanol, respectivamente.

### **3.1.2. Memória condicionada ao lugar**

O condicionamento clássico, como mencionado anteriormente, é o paradigma mais utilizado no estudo das bases neurobiológicas da memória. Entretanto, o estabelecimento de uma memória contextual está condicionado ao uso do choque como estímulo incondicionado. Alternativamente, memórias condicionadas ao contexto podem ser estabelecidas utilizando o paradigma chamado de preferência (**CPP**, do inglês *Conditioned Place Preference*) ou aversão (**CPA**, do inglês *Conditioned Place Avoidance*) condicionada ao lugar.

O primeiro estudo a utilizar o CPP foi realizado por Spragg, em 1940. O protocolo consistia em expor chipanzés a dois compartimentos. Um deles era branco e todas as vezes que o animal era colocado lá recebia uma dose de morfina. O outro compartimento era preto, onde escondiam uma banana. Após algumas sessões de condicionamento os cientistas observaram que quando o animal já tinha recebido sua dose diária de morfina ele escolhia o compartimento com a banana. Entretanto, caso a administração de morfina não tivesse ocorrido, o animal escolhia o compartimento branco. Utilizando desse conhecimento, Beach (1957) observou que ratos viciados em morfina podiam ser treinados para escolherem o braço branco no labirinto em Y, se este braço era pareado com a droga por apenas algumas sessões. Em 1976, Rossi & Reid usaram um protocolo de CPP onde um compartimento era pareado com a morfina e o outro com salina. Os autores expressaram o resultado como índice

de preferência. Este índice consistia em dividir o tempo gasto no compartimento antes do condicionamento pelo tempo gasto no mesmo compartimento após o condicionamento com morfina. Neste caso, o grupo de animais controle, que somente recebiam salina, deveria apresentar um índice de 0. Por outro lado, os animais condicionados com morfina, deveriam apresentar valores maiores que zero. Após os autores demonstrarem os resultados desta forma, muitos outros cientistas o utilizam, alguns com algumas modificações.

Os detalhes na metodologia variam de acordo com o propósito do experimento. Porém, um típico CPP inclui dois ambientes (contextos) diferentes onde ocorrerá o condicionamento com o estímulo de interesse. O contexto pode diferir em alguns aspectos, como por exemplo, tamanho ou forma dos compartimentos, cor ou listras nas paredes, entre outros.

Partindo da mesma premissa que um animal preferirá um contexto onde recebeu algo apetitivo, se este contexto for pareado com algum estímulo aversivo, espera-se que este animal evite este contexto quando ele tiver chance de o fazê-lo (CPA). Algumas drogas, como a nicotina (KUTLU et al, 2016; RISINGER & OAKES, 1995), são capazes de causar no animal tanto CPP, quanto CPA, sendo que a resposta dependerá da concentração da droga e da linhagem do animal escolhida. Outros estímulos, como os dolorosos (HOLAHAN & WHITE, 2004; WALLACE & ROSEN, 2000) ou odores desagradáveis, como o TMT (ENDRES & FENDT, 2007; WALLACE & ROSEN, 2000) podem causar CPA. Desta forma, o paradigma de memória condicionada ao lugar pode ser utilizado para induzir uma memória contextual aversiva ou apetitiva, diferentemente do paradigma de condicionamento clássico onde a natureza do estímulo incondicionado é sempre aversiva. Como estímulos, para realização do condicionamento, retiramos a ideia de situações reais que acontecem com os animais nos seus habitats naturais.

### **3. 2. Relações ecológicas**

Os animais nos seus ecossistemas estão envolvidos em diversas relações ecológicas. Relações ecológicas são interações entre os seres vivos

de uma comunidade. As relações ecológicas podem ocorrer entre indivíduos da mesma espécie – intraespecíficas, ou entre indivíduos de espécies diferentes – interespecíficas. Essas relações ecológicas ainda podem ser classificadas de acordo com o benefício ou não que elas trazem para os indivíduos envolvidos (RICKLEFS, 2010).

A **competição**, realizada entre indivíduos da mesma espécie e a **predação**, cujos indivíduos envolvidos são de espécies diferentes são ambas relações sem benefício, ou seja, há prejuízo pelo menos para uma das partes envolvida.

Ainda é possível identificar relações entre indivíduos da mesma espécie, que apesar de não serem classificadas como ecológicas, são de suma importância para a sobrevivência da espécie. Esse é o caso da **interação sexual**, cuja consequência de sucesso será a reprodução e a perpetuação da espécie.

### 3.2.1. Predação

A predação é uma interação biológica onde o predador alimenta-se da sua presa. Um exemplo dessa interação é a que ocorre entre a raposa e o roedor. Como resultado da relação entre a presa e o predador ocorrem diversos comportamentos relacionados à fuga, ansiedade, dentre outros (TAKAHASHI et al., 2005).

As bases etológicas da predação podem ser aplicadas em modelos animais (camundongos ou ratos) de laboratório. Por exemplo, secreções, imagens ou até mesmo os próprios predadores podem ser utilizados como estímulos incondicionados, ou seja, como estímulos que desencadeiam respostas de medo inato. Uma grande gama de estudos tem utilizado odores e imagens relacionadas à felídeos, especialmente gatos (AREDA et al., 2006; BLANCHARD et al., 2001; HACQUEMAND et al., 2013; MUÑOZ-ABELLÁN et al., 2009). Alternativamente, canídeos e seus odores também têm sido utilizados em laboratório. Uma das moléculas mais utilizadas em laboratório como estímulo incondicionado é o TMT (2,4,5 – trimetil – 3 - triazolina) que é sintetizado a partir da glândula anal da raposa. O TMT pode ser utilizado em

protocolos de condicionamento (ENDRES & FENDT, 2007, 2009; FORTES-MARCO et al., 2015) e também para estudar as vias neurais ligadas ao medo inato (JANITZKY et al., 2015; ROOT et al, 2014; SAITO et al, 2017; WANG et al, 2013).

### **3.2.2. Competição**

A competição é um comportamento que existe em diversos grupos de animais, desde as bactérias até os mamíferos, já que é quase sempre necessário competir para ter sucesso reprodutivo e para se alimentar.

Em ambiente laboratorial, é possível estudar alguns aspectos da competição a partir de parâmetros comportamentais que são desencadeados durante o confronto de dois animais adultos. São estes comportamentos àqueles ligados à agressividade e à hierarquia. De maneira interessante, roedores compartilham com humanos e primatas diversos comportamentos sociais subjacentes ao reconhecimento do status hierárquico (WANG et al, 2014), e até mesmo apresentam uma forma mais primitiva de empatia (PANKSEPP & PANKSEPP, 2013). Além disso, roedores são capazes de adaptar sua estrutura social frente a desafios do ambiente (SHEMESH et al, 2013).

### **3.2.3. Interação sexual**

A interação sexual, com a consequente reprodução, é de suma importância para a perpetuação da espécie. De maneira geral, estas interações são compostas de diferentes repertórios comportamentais, que diferem entre machos e fêmeas, e ocorrem de forma estereotipada (GUARRACI & BOLTON, 2013; SWIFT-GALLANT & MONKS, 2017).

Em roedores, a corte é realizada pelo macho e é caracterizada por intensa exploração olfativa das áreas genitais, vocalização e tentativas de monta (MATSUMOTO & OKANOYA, 2016). Quando a fêmea aceita o macho, esta exhibe comportamento de lordose, permitindo que o macho monte e ocorra a intromissão, seguida de ejaculação (YANG & SHAH, 2016).

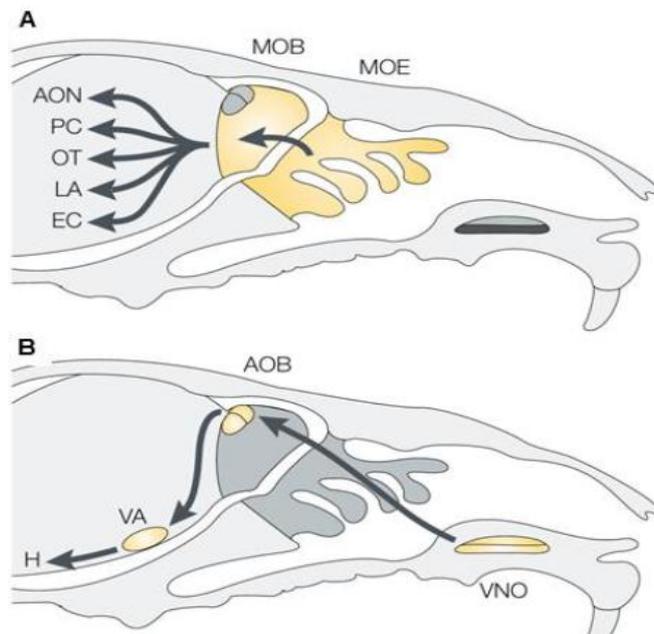
Em roedores, o reconhecimento de um parceiro sexual depende quase que inteiramente de inputs olfatórios. De maneira semelhante, a detecção de predadores ou de um competidor é feita principalmente por meio do sistema olfatórios (HASHIKAWA et al., 2017).

### **3.3 Sistema olfatório e processamento de odores**

O sistema olfatório de roedores é dividido em dois “sub-sistemas” que se complementam e interagem entre si: o Sistema Olfatório Principal (MOS, do inglês “*Main Olfactory System*”) e o Sistema Olfatório Acessório (AOS, do inglês “*Accessory Olfactory System*”).

O MOS é constituído pelo epitélio olfatório, que possui projeções para o bulbo olfatório principal através de neurônios glutamatérgicos, as células mitrais. Acredita-se que esse sistema seja responsável pela captação de odores voláteis, sejam eles de origem social ou não. A codificação da informação sensorial que passa pelo MOS segue em direção às regiões de processamento primário, tais como o tubérculo olfatório e o núcleo olfatório anterior, bem como regiões dos córtices piriforme e entorrinal; e para a amígdala lateral (RODOLFI & LODOVICH, 2015; DULAC & TORELLO, 2003) (Figura 1A).

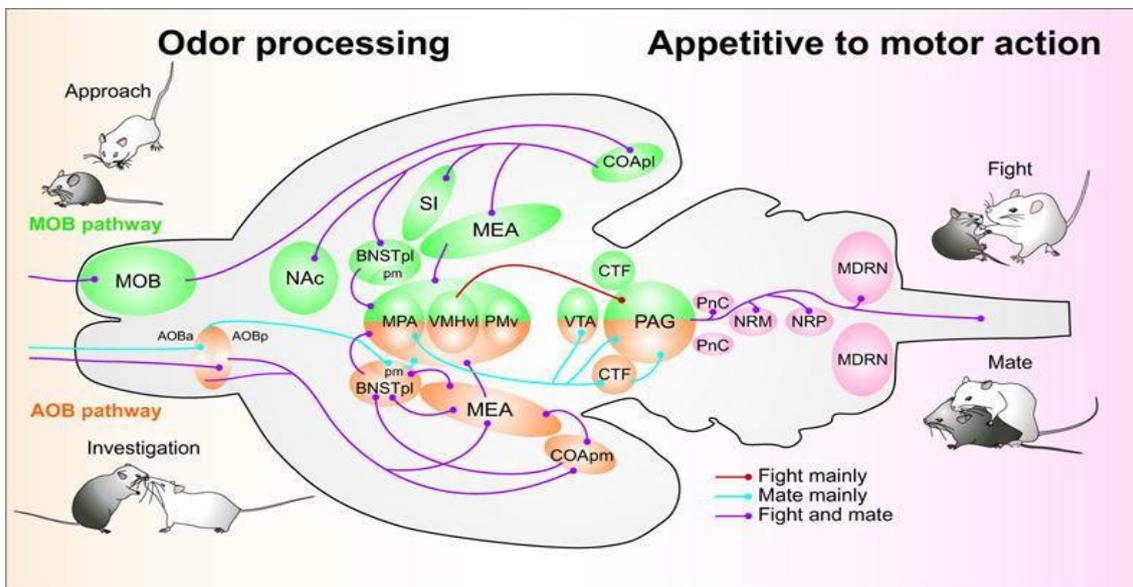
O AOS é formado pelo órgão vomeronasal, cujos neurônios olfativos projetam para o bulbo olfatório acessório. Odores não voláteis e peptídeos são diluídos no lúmen do epitélio acessório e com o auxílio das bombas de muco expressas nos neurônios olfativos, que são células ciliadas, são identificados. Após esse primeiro processamento, a informação é enviada para duas regiões do encéfalo: (1) o hipotálamo, que comanda as respostas neuroendócrinas envolvidas nos comportamentos sociais e (2) a amígdala vomeronasal que processará o aspecto emocional envolvido com o odor (DULAC & TORELLO, 2003).



**Figura 1:** Sistema olfatório de roedores: Em **A** está 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 (OT) e a porção lateral da amígdala cortical (LA). Em **B** está representado o sistema olfativo acessório. Os estímulos não-voláteis são captados pelo órgão vômeronasal 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).

O repertório de cheiros que o sistema olfativo é capaz de detectar é virtualmente infinito. Entretanto, o destino das projeções do bulbo olfatório pode variar de acordo com a relevância emocional e etológica do odor que foi detectado. O reconhecimento de co-específicos se dá através de feromônios, que são moléculas liberadas pelos indivíduos para comunicar sobre o status social e reprodutivo do animal que o liberou. Estes feromônios são capazes de desencadear comportamentos sociais e reprodutivos inatos, como também acarretar mudanças neuroendócrinas nos animais que entram em contato com essas moléculas (HALPERN, 1987). Os feromônios são importantes para diversos animais, porém para os animais territorialistas possuem uma importância maior, principalmente nos mamíferos (DULAC & TORELLO, 2003).

Sinais químicos de co-específico, sejam para a formação de pares ou simples reconhecimento são processados de maneira semelhante. A informação é detectada no MOS, cujas células mitrais possuem projeções para amígdala cortical posterolateral (COApl). Deste último local, a informação é transmitida para amígdala medial (MeA), amígdala central (CeA), núcleo accumbens (NAc), dentre outros. Já o AOS possui projeções diretas para a MeA e amígdala cortical posteromedial (COApm). A integração neuroendócrina destes odores de co-específicos ocorre no hipotálamo, sendo que a porção ventrolateral do hipotálamo ventromedial (VMHvl) é mais importante para o comportamento de agressividade e a área préóptica media (MPA) mais importante para a formação de pares. Por fim, as informações chegam à substância cinzenta periaquedutal (PAG) de onde partirá o comando para os comportamentos apropriados (HASHIKAWA et al., 2017) (Figura 2).



**Figura 2:** Circuitos neurais que participam em diferentes fases dos comportamentos sexuais e agressivos em roedores. Linhas vermelhas, azuis e roxas indicam caminhos envolvidos principalmente na luta, no acasalamento ou em ambos. AOBa: bulbo olfatório acessório anterior; AOBp: posterior AOB; BNSTpl / pm: núcleo do leito da estria terminal posterolateral / posteromedial; CoA pl/pm: amígdala cortical posterolateral / posteromedial; CTF: campo tegmental central; MDRN: núcleo reticular medular; MEA: amígdala medial; MOB: bulbo olfativo principal; MPA: área préóptica medial; NAc: núcleo accumbens; NRM: núcleo da rafe magnus;



choque nas patas, a memória resultante terá sempre valência negativa. Entretanto, nem todas as nossas memórias são negativas.

Alguns estudos recentes têm sido realizados para compreender como o cérebro diferencia memórias positivas e negativas. Namburi et al. (2016) demonstraram que a amígdala basolateral (BLA) é capaz de codificar ambos estímulos negativo (como o gosto amargo do quinino) e positivo (como o gosto de sacarose). Entretanto, a eferência da BLA para o núcleo accumbens (NAc) é potenciada quando o animal é apresentado ao estímulo positivo, enquanto que a eferência da BLA para o núcleo medial da amígdala central (CeM) medeia a valência do estímulo negativo. Logo, a diferenciação na codificação de estímulos positivos e negativos estaria relacionada a circuitos neurais distintos. Além disso, uma memória negativa pode adquirir uma valência positiva. Redondo e colaboradores (2014) demonstraram que a valência da memória pode ser mutável, ou seja, a associação inicial para uma memória negativa pode ser revertida para uma associação de memória positiva, se houver a reativação do engrama formado no giro denteado do hipocampo.

No presente estudo, nos propusemos a utilizar o CPA e CPP para induzir memórias contextuais de valências opostas.

Todas as memórias de longa-duração passam inevitavelmente por processos moleculares que irão favorecer sua persistência ou o seu esquecimento. De fato, estudos recentes têm demonstrado que ambos os processos de persistência e esquecimento de memórias dependentes do hipocampo envolvem mecanismos moleculares específicos (Bekinschtein et al., 2007; Bekinschtein et al., 2010; Katche et al., 2013; Akers et al., 2014; Sachser et al., 2016). Entretanto, é desconhecido se a relação persistência/esquecimento muda de acordo com a valência da memória.

Sabendo que o cérebro processa informações com valências opostas, possivelmente através de circuitos diferentes, testamos a hipótese de que memórias de valência negativa são estabelecidas mais facilmente, além de persistirem por mais tempo em comparação às memórias de valência positiva.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar se a valência da memória, positiva ou negativa, afeta a persistência de memórias contextuais.

### **4.2. Objetivos específicos**

1. Estabelecer um protocolo de memória contextual de valência negativa, que tenha o sistema olfativo como principal entrada de informações;
2. Estabelecer um protocolo de memória contextual de valência positiva, que tenha o sistema olfativo como principal entrada de informações;
3. Avaliar a persistência de memórias contextuais positivas e negativas;
4. Verificar se as respostas comportamentais de medo, ocorridas durante o condicionamento ao TMT, correlacionam-se à persistência da memória contextual de valência negativa;
5. Verificar se as respostas comportamentais apetitivas, ocorridas durante o condicionamento à fêmea, correlacionam-se à persistência da memória contextual de valência positiva.

## **5. Justificativa**

É sabido que os circuitos neurais subjacentes à formação de memórias negativas e positivas não são sobrepostos, ou seja, existe uma via para a formação de memórias positivas e possivelmente outra para memórias negativas. Após a formação dessas memórias com valências opostas, estas não necessariamente irão persistir igualmente. Neste cenário, estudos que busquem a compreensão da valência de memórias são essenciais para o avanço do conhecimento neste campo das neurociências.

A maioria dos paradigmas utilizados para induzir uma memória contextual utiliza o choque nas patas para estudar a formação de memórias. Porém esta memória contextual será sempre negativa pois envolve o estímulo aversivo do choque. Sendo assim, é difícil, senão impossível, comparar valências de memórias utilizando um mesmo paradigma, com ativação de vias sensoriais de entrada semelhantes. No presente estudo nos propusemos a desenvolver protocolos, utilizando um paradigma conhecido como condicionamento ao lugar, para estudar memórias de valências opostas, geradas por estímulos sensoriais semelhantes. Acreditamos que o estabelecimento e padronização de ensaios comportamentais compreendem os primeiros passos para o estudo adequado das bases neurobiológicas de memórias.

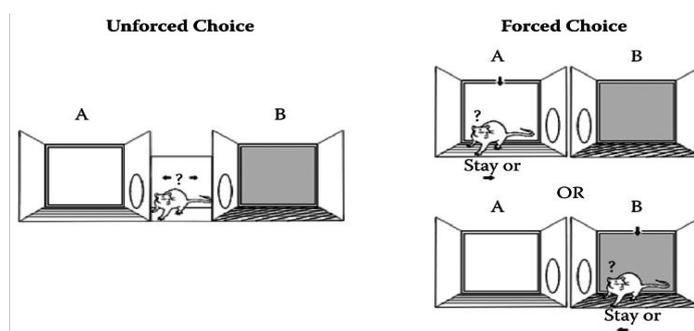
## 6. Materiais e métodos

### 6.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 (Biotério Central) com idade mínima de 8 semanas. Os animais foram alocados em grupos de 5 animais por gaiola ou isolados, dependendo do experimento. As gaiolas foram mantidas em estante ventilada com temperatura ambiente de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade entre 40- 70%, ciclo claro-escuro de 12/12 horas e livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética animal através do CEUA 212/2016.

### 6.2. Paradigma de condicionamento ao lugar

O teste foi realizado numa caixa contendo três compartimentos de igual tamanho (21cm largura x 42,5 cm de comprimento X 27 cm de altura), porém foram usados apenas 2 compartimentos. Optamos por utilizar apenas dois compartimentos após inúmeras tentativas frustradas de condicionar os animais utilizando os 3 compartimentos (dados não mostrados). Utilizamos então o protocolo de CPP e CPA chamado de “escolha forçada” (forced choice) (Figura 5).



**Figura 5:** Escolha não forçada (do inglês *Unforced Choice*) versus escolha forçada (do inglês *Forced choice*). No procedimento de escolha forçada, a área central não é utilizada. Já na escolha não forçada, existe o compartimento central que trata-se de uma área neutra. Adaptado de Buccafusco, JJ, 2009.

Optamos por realizar o experimento comportamental no escuro, usando apenas uma fonte de luz vermelha, após identificarmos que os animais têm dificuldade em condicionar na luz branca (dados não mostrados).

Na sessão de habituação, o animal foi colocado em um dos dois compartimentos, com as portas abertas e durante 20 minutos o animal explorou livremente a caixa. Para excluir o viés de preferência ou aversão inata a um dos compartimentos, quantificamos o tempo de permanência em cada compartimento durante a habituação. Para os animais condicionados aos estímulos positivos, usamos o compartimento menos preferido pelos animais como aquele que seria pareado com o estímulo. Já para os animais condicionados aos estímulos negativos, usamos o compartimento mais preferido pelos animais como aquele que seria pareado com o estímulo (CALCAGNETTI & SCHECHTER, 1994).

No dia seguinte à habituação, iniciou-se o condicionamento. Os animais foram expostos a 6 sessões de 5 minutos diárias de condicionamento. Os dias foram intercalados, sendo que num dia o animal ficou confinado ao contexto com o estímulo condicionado e no outro dia confinado ao contexto com o estímulo neutro. Na sessão de teste, os animais foram colocados no compartimento que foram condicionados e após 30s a porta que dava acesso ao outro compartimento foi aberta e durante 10 minutos o animal explorou livremente a caixa. A memória contextual foi testada 1 e 7 dias após o término do condicionamento.

Para todas as sessões o aparato foi limpo com álcool 70% de um animal para o outro. Todas as sessões foram filmadas e os filmes analisados off-line.

Os resultados foram expressos como índice de preferência ou esquia (tempo no compartimento condicionado durante a habituação – tempo no compartimento condicionado durante o teste). Também expressamos os resultados em tempo bruto, ou seja, o tempo em segundos gastos no compartimento condicionado antes (pré-teste) e após o condicionamento (teste).

### **6.2.1. TMT como estímulo incondicionado**

O TMT foi utilizado na concentração de 0,1% e o mesmo foi dissolvido em PBST. 10 uL de TMT ou PBST eram pipetados em um papel filtro que foi colocado dentro de uma placa de Petri. A placa contendo TMT era alocada no compartimento da caixa onde seria o condicionamento. No dia seguinte o mesmo era feito, porém, com o PBST colocado no compartimento oposto ao do TMT. Animais controle recebiam PBST nos dois compartimentos. Sempre começávamos o protocolo com os animais controle. Usávamos o TMT no mesmo dia, para evitar contaminação. Ao término do dia a caixa era lavada com água e sabão e após higienizada com álcool 70%. Entre as sessões no mesmo dia, a caixa era higienizada com álcool 70%.

### **6.2.2. Competição como estímulo incondicionado**

Para simular uma competição utilizamos um protocolo de derrota social (SD, do inglês *Social Defeat*) modificado. Utilizamos camundongos CD1, pois eles possuem uma agressividade basal maior e são maiores que os animais testes. Camundongos CD1 machos adultos foram previamente isolados por no mínimo 4 semanas para aguçar a sua agressividade. Após esse tempo, foi realizada uma triagem que consistiu na introdução de um camundongo adulto macho na caixa do CD1 por 5 minutos, durante 3 dias consecutivos. Apenas os animais CD1 que agrediram o intruso por pelo menos 2 sessões foram utilizados no protocolo de condicionamento.

O condicionamento ocorreu pela colocação do animal experimental no compartimento com o CD1 agressivo. Para cada um dos 3 dias de condicionamento usamos CD1s diferentes para evitar que o animal experimental habituas-se ao CD1. No compartimento controle não era apresentado qualquer estímulo. Animais controle não foram expostos ao CD1. O aparato era higienizado com álcool 70% entre um animal e outro.

### **6.2.3. Interação sexual como estímulo incondicionado**

Para a interação com a fêmea utilizamos um protocolo modificado de Ramirez e colaboradores (2015). Utilizamos fêmeas adultas C57/BL6 virgens, nesse estímulo não controlamos o ciclo das fêmeas, pois utilizando o

paradigma do Ramirez onde foi utilizado fêmeas intactas e não foi observado o ciclo das mesmas.

A fêmea era apresentada ao animal experimentador dentro de um cilindro com 60 orifícios para evitar a cópula. Para cada um dos 3 dias de condicionamento usamos fêmeas diferentes para evitar que o animal experimental habituas-se à fêmea. No compartimento controle era apresentado o cilindro vazio. Animais controle eram expostos apenas ao cilindro vazio nos dois compartimentos. O aparato era higienizado com álcool 70% entre um animal e outro.

#### **6.2.4. Urina de fêmeas como estímulo incondicionado**

Optamos por testar a urina da fêmea por considerar que equipar-se-ia com o TMT, já que ambos são estímulos olfativos puramente, embora com valências opostas. Acompanhamos o ciclo estral de diferentes fêmeas adultas C57/BL6 pelo esfregaço vaginal. Que consiste na retirada de uma amostra de secreção da fêmea por sua vagina utilizando salina e colocando uma gota numa lâmina para visualização no microscópio.

A urina da fêmea era retirada apenas nos dias em que se encontrava em pró-estro, que é a sua fase receptiva com altos níveis de estradiol séricos. Após a retirada da urina, essa era acondicionada em -20C até a sua utilização.

3 uL de urina ou salina eram pipetados em um papel filtro que foi colocado dentro de uma placa de Petri. A placa contendo a urina era alocada no compartimento da caixa onde seria o condicionamento. No dia seguinte o mesmo era feito, porém com salina colocada no compartimento oposto. Animais controle recebiam salina nos dois compartimentos.

### **6.3 Comportamentos avaliados**

#### **6.3.1. Contexto negativo**

##### **6.3.1.1. Exposição ao TMT**

Durante as sessões de condicionamento ao TMT, quantificamos: a porcentagem de congelamento (*freezing*), tempo de auto-limpeza (*grooming*) e número de eventos de exploração vertical (*rearing*).

#### **6.3.1.2. Interação com CD1**

Durante as sessões de condicionamento ao CD1, quantificamos diferentes parâmetros de comportamentos agressivos, em número e tempo de duração: ataque, mordidas, serpentear de cauda e perseguição.

#### **6.3.2. Contexto positivo**

##### **6.3.2.1 Interação com a fêmea**

Durante as sessões de condicionamento à presença da fêmea, quantificamos o tempo de interação social entre o macho e a fêmea. Contabilizamos o tempo e o número de vezes que o macho inseria seu focinho ou vibrissas nos orifícios do cilindro.

##### **6.3.2.2. Urina da fêmea**

Durante as sessões de condicionamento à presença da urina, quantificamos o tempo e a frequência que o animal permaneceu próximo à placa de petri onde se encontrava o papel filtro com a urina da fêmea.

#### **6.4. Análise estatística**

Para os resultados expressos como tempo bruto em cada compartimento, utilizamos ANOVA de 2 vias de medidas repetidas com *post-hoc* de Bonferroni, sendo um fator a sessão (pré-teste X teste) e o outro o condicionamento (TMT X PBST; CD1 X nada; fêmea X cilindro; urina X salina).

Os resultados expressos como índice ( $\Delta\text{tempo} = \text{tempo no teste} - \text{tempo no pré-teste}$ ) foram analisados pelo t-test de amostras independentes.

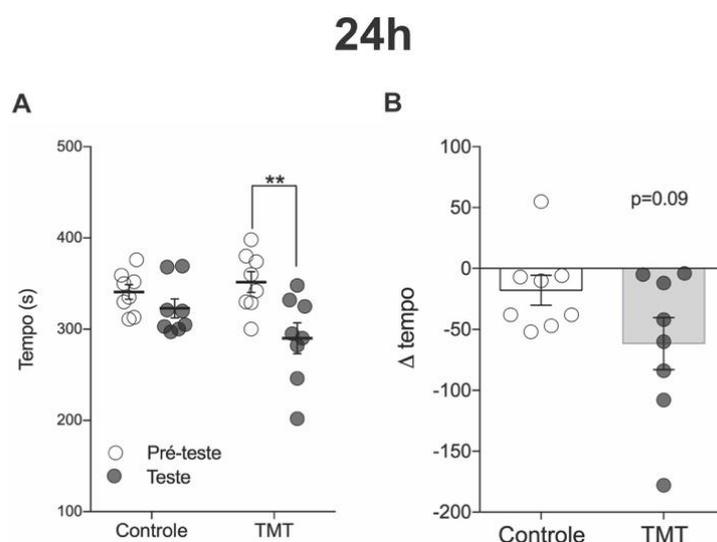
Os comportamentos analisados durante o condicionamento foram analisados por ANOVA de 1 via ou de 2 vias, ambas de medida repetida e com *post-hoc* de Bonferroni. Quando os resultados foram somados entre as 3

sessões de condicionamento, comparamos as médias dos grupos por teste t de amostras independentes.

## 7. Resultados

### 7.1. Uso do TMT no paradigma de aversão condicionada ao lugar forma memória contextual de valência negativa

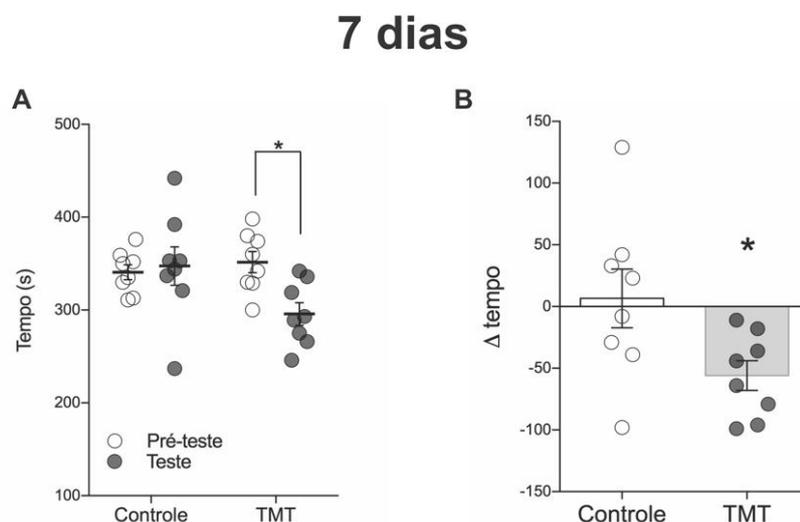
A memória contextual de valência negativa, induzida pela aversão condicionada ao lugar utilizando o TMT como estímulo incondicionado foi testada 24h e 7 dias após o condicionamento. No teste realizado 24h após o condicionamento, não observamos efeito na interação ( $F_{(1,28)}=3.2$ ;  $p=0.08$ ) entre os fatores. Também não detectamos efeito principal da sessão ( $F_{(1,28)}=0.81$   $p=0.37$ ). Entretanto, observamos efeito principal do fator condicionamento ( $F_{(1,28)}=10.7$   $p=0.002$ ); havendo diferença entre pré-teste e teste apenas no grupo TMT ( $p<0.01$ ) (Figura 6A). A análise do índice de aversão não revelou diferença estatística entre os grupos ( $t_{(14)}=1.77$ ,  $p=0.09$ ) (Figura 6B).



**Figura 6:** Memória contextual de valência negativa induzida pelo TMT testada 24h após o condicionamento. **(A)** Tempo gasto no compartimento onde o condicionamento com PBS (controle,  $n=8$ ) ou TMT ( $n=8$ ) foi realizado, antes (pré-teste) e após condicionamento (teste). **(B)** índice de aversão calculado pelo  $\Delta$  tempo (tempo teste - tempo no pré-teste). \*\* indica diferença entre pré-teste e teste ( $p<0.01$ ).

Realizamos o teste de memória contextual novamente, 7 dias após o condicionamento. Observamos uma interação entre os fatores ( $F_{(1,28)}=5$ ,  $p=0.03$ ), logo, avaliamos os fatores separadamente. O teste-t pareado revelou

não haver diferença entre as sessões no grupo controle ( $t_{(7)}=0.27$ ,  $p=0.78$ ), no entanto, houve diferença no grupo TMT ( $t_{(7)}=4.05$ ,  $p=0.002$ ) (Figura 7A). Além disso, também detectamos diferença entre os grupos quanto ao índice de aversão ( $t_{(14)}=2.34$ ,  $p=0.03$ ) (Figure 7B).



**Figura 7:** Memória contextual de valência negativa induzida pelo TMT testada 7 dias após o condicionamento. **(A)** Tempo gasto no compartimento onde o condicionamento com PBS (controle,  $n=8$ ) ou TMT ( $n=8$ ) foi realizado, antes (pré-teste) e após condicionamento (teste). **(B)** índice de aversão calculado pelo  $\Delta$  tempo (tempo teste-tempo no pré-teste). \* indica diferença entre pré-teste e teste ( $p<0.05$ ) ou diferença entre os grupos.

Em conjunto, nossos resultados mostram que camundongos C57/BL6 machos condicionam ao TMT. Além disso, a memória contextual formada por este condicionamento persiste por até 7 dias.

## 7.2. Exposição repetida ao TMT aumenta comportamentos relacionados à ansiedade e medo.

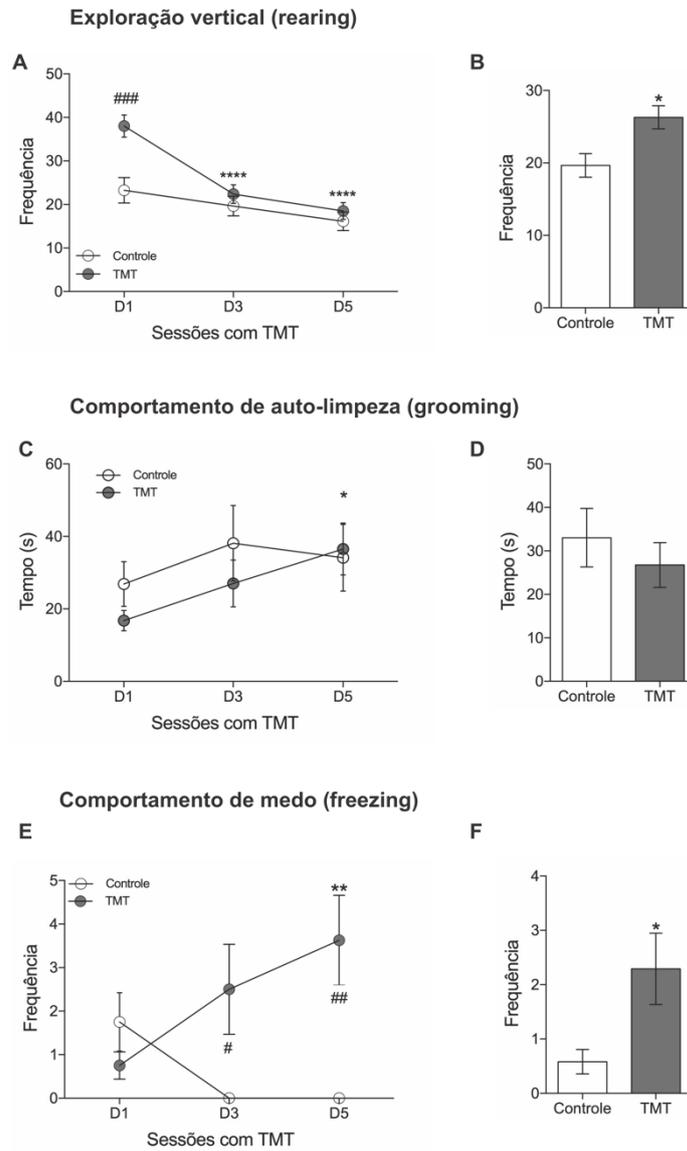
Avaliamos três comportamentos distintos durante o condicionamento ao TMT, para verificar o efeito tempo-dependente deste estímulo aversivo. Observamos que ao longo dos dias de condicionamento, os animais expostos ao TMT diminuem progressivamente o comportamento de exploração vertical ou *rearing* (Interação:  $F_{(2,28)}=5.5$ ,  $p=0.009$ ; Sessão:  $F_{(2,28)}=21$ ,  $p<0.001$ ; Condicionamento:  $F_{(1,14)}=8.52$ ,  $p=0.01$ ) (Figura 8A). Não observamos diferença

nos animais controle ao longo das sessões. Entretanto, apesar da diminuição progressiva ao longo do condicionamento, a frequência média deste comportamento foi maior nos animais TMT ( $t_{(14)}=2.9$ ,  $p=0.01$ ) (Figura 8B).

O comportamento de auto-limpeza, ou *grooming*, no grupo TMT, mas não no grupo controle, aumentou ao longo das sessões de condicionamento (Interação:  $F_{(2,28)}=0.9$ ,  $p=0.39$ ; Sessão:  $F_{(2,28)}=3.4$ ,  $p=0.04$ ; Condicionamento:  $F_{(1,14)}=0.54$ ,  $p=0.4$ ) (Figura 8C). Porém, não observamos diferença entre os grupos quanto a média deste comportamento durante o condicionamento ( $t_{(14)}=0.74$ ,  $p=0.47$ ) (Figura 8D).

Um dos comportamentos mais observados em situações de medo, como é o caso da exposição ao TMT, é o congelamento ou *freezing*. Indicando que os animais condicionados foram de fato expostos ao TMT, observamos um aumento de freezing nos animais TMT ao longo do condicionamento, e em comparação aos animais controle (Interação:  $F_{(2,28)}=9.2$ ,  $p<0.0008$ ; Sessão:  $F_{(2,28)}=0.6$ ,  $p=0.5$ ; Condicionamento:  $F_{(1,14)}=6$ ,  $p=0.02$ ) (Figure 8E). Além disso, o grupo TMT apresentou uma média maior deste comportamento durante o condicionamento ( $t_{(14)}=2.43$ ,  $p=0.02$ ) (Figura 8F).

# Condicionamento ao TMT



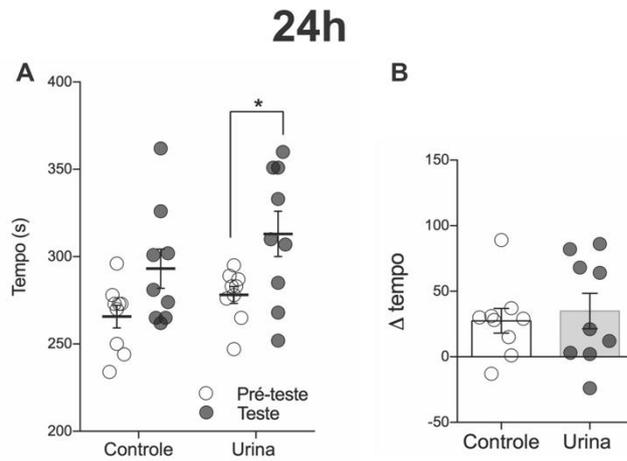
**Figura 8:** Comportamentos relacionados ao medo e ansiedade durante os três dias alternados de condicionamento ao TMT (D1, D3 e D5). **(A)** A frequência de rearing diminui ao longo do condicionamento no grupo TMT (n=8) (\*\*\*\*p<0.00001), mas é maior em comparação ao grupo controle (n=8) no D1 (###p<0.001) e na **(B)** média dos 3 dias (\*p<0.05). **(C)** O tempo de grooming aumentou no grupo TMT ao longo do condicionamento (\*p<0.05), **(D)** porém não houve diferença na média entre os grupos. **(E)** O TMT aumentou a frequência de freezing no D5 em comparação aos demais dias (\*\*p<0.01) e foi mais alto em comparação ao controle (#p<0.05; ###p<0.01). **(F)** O TMT também aumentou a média de frequência de freezing no condicionamento, em comparação ao grupo controle (\*p<0.05).

## 7.3. Preferência condicionada ao lugar com urina de fêmea em proestro forma memória contextual de valência positiva

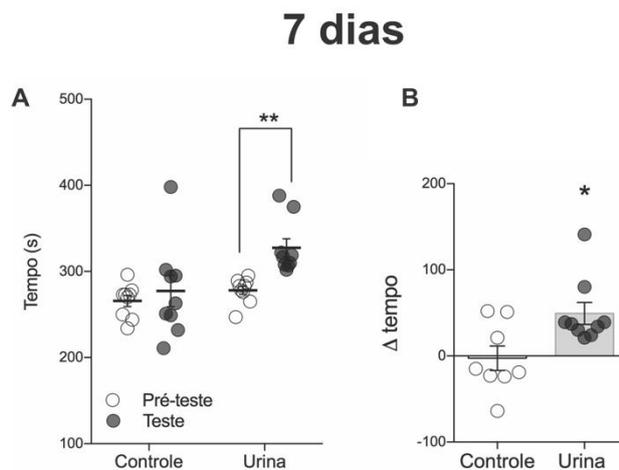
Após identificarmos que o TMT foi capaz de formar uma memória contextual negativa, buscamos estabelecer um paradigma que fosse capaz de formar uma memória contextual positiva, usando também um estímulo olfativo. Optamos por utilizar urina de fêmeas C57/BL6 em fase proestro, que se trata da fase do ciclo estral onde a fêmea está receptiva sexualmente.

Vinte e quatro horas após o término do condicionamento, observamos a preferência dos machos pelo compartimento pareado com a presença de urina. Não houve interação entre os fatores ( $F_{(1,16)}=0.2$ ,  $p=0.65$ ). Também não detectamos efeito principal do condicionamento ( $F_{(1,16)}=2.34$ ,  $p=0.14$ ). Entretanto, observamos efeito principal do fator sessão ( $F_{(1,28)}=14.3$ ,  $p=0.001$ ); havendo diferença entre pré-teste e teste apenas no grupo exposto à urina de fêmea ( $p<0.05$ ) (Figura 9A). Entretanto, a análise do delta tempo não revelou diferença entre os grupos ( $t_{(16)}=0.45$ ,  $p=0.6$ ) (Figura 9B).

Repetimos o teste de memória contextual 7 dias após o condicionamento. Observamos, então, um efeito principal da sessão ( $F_{(1,16)}=7.6$ ,  $p=0.01$ ) e do condicionamento ( $F_{(1,16)}=7.4$ ,  $p=0.01$ ), havendo diferença entre pré-teste e teste apenas no grupo urina ( $p<0.01$ ). Não houve interação entre os fatores ( $F_{(1,16)}=2.7$ ,  $p=0.1$ ) (Figura 10A). Na figura 10B, podemos observar uma diferença estatística entre os grupos com relação ao delta tempo ( $t_{(15)}=2.7$ ,  $p=0.01$ ), ou seja, os animais condicionados com urina mostraram preferência pelo contexto 7 dias pós-condicionamento.



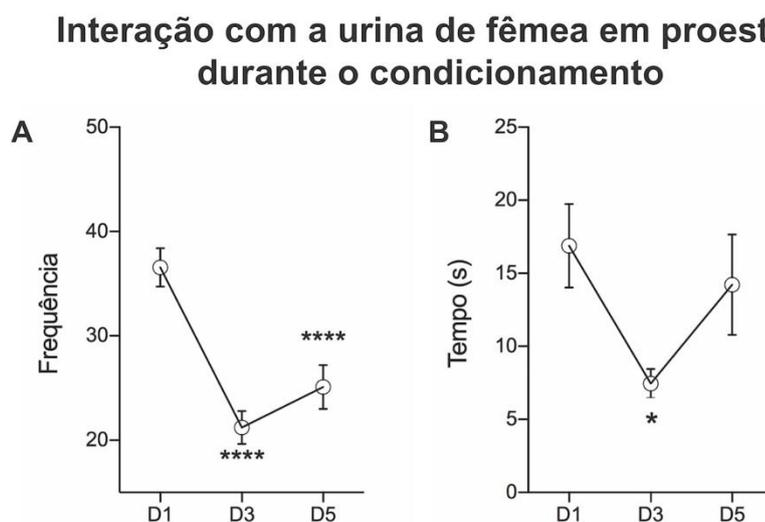
**Figura 9:** Memória contextual de valência positiva induzida pela urina de fêmea em proestro testada 24h após o condicionamento. **(A)** Tempo gasto no compartimento onde o condicionamento com salina (Controle, n=9) ou urina de fêmea (Urina, n=9) foi realizado, antes (pré-teste) e após condicionamento (teste). **(B)** Índice de preferência calculado pelo  $\Delta$  tempo (tempo teste-tempo no pré-teste). \* indica diferença entre pré-teste e teste ( $p < 0.05$ ).



**Figura 10:** Memória contextual de valência positiva induzida pela urina de fêmea em proestro testada 7 dias após o condicionamento. **(A)** Tempo gasto no compartimento onde o condicionamento com salina (Controle, n=9) ou urina de fêmea (Urina, n=9) foi realizado, antes (pré-teste) e após condicionamento (teste) \*\* indica diferença entre pré-teste e teste ( $p < 0.01$ ). **(B)** Índice de preferência calculado pelo  $\Delta$  tempo (tempo teste-tempo no pré-teste). \*indica diferença entre grupos ( $p < 0.05$ ).

#### 7.4. Machos alteram a intensidade com que exploram a urina de fêmeas em proestro durante as sessões de condicionamento

Vimos anteriormente que foi possível estabelecer uma memória contextual positiva em camundongos C57BL6 machos, usando a urina de fêmea em proestro como estímulo incondicionado de valência positiva. Para verificar se os animais de fato interagiram com a urina da fêmea durante o condicionamento, quantificamos a frequência e o tempo de exploração. Observamos que tanto para a frequência ( $F_{(1,6;13,4)}=46.7$ ,  $p<0.0001$ ) (Figura 11A), quanto para o tempo ( $F_{(1,9;15,5)}=6$ ,  $p<0.05$ ) (Figura 11B) houve uma diminuição da exploração ao longo das sessões de condicionamento.

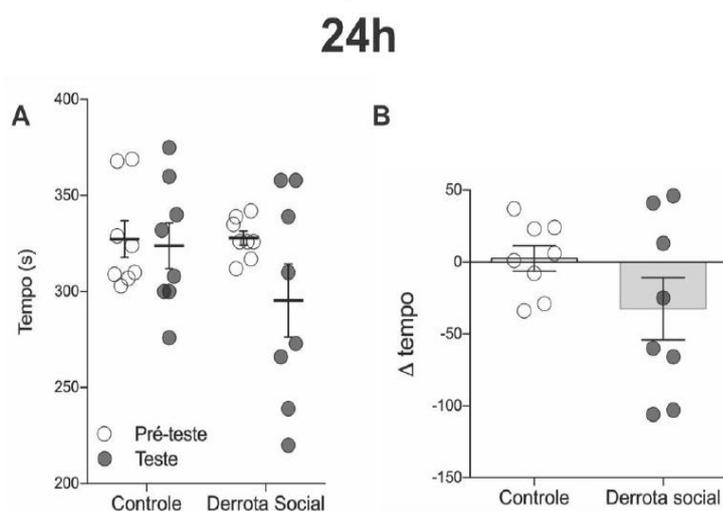


**Figura 11:** Frequência (A) e tempo (B) gasto pelo macho interagindo com o papel filtro contendo amostra de urina de fêmeas em proestro, durante as sessões de condicionamento (D1, D3 e D5) \*\*\*\*  $p<0.0001$  e \* $p<0.05$  indicam diferença de D1.

### 7.5. Derrota social não induz memória contextual de valência negativa no paradigma de aversão condicionada ao lugar

Após verificarmos que odores de origem social positivos (urina de fêmea) e negativos (TMT) podem ser usados como estímulos incondicionados para formar uma memória contextual, decidimos avaliar se um evento social, que se trata de uma condição mais complexa, polimodal, poderia ser utilizada para induzir memórias contextuais de valências opostas.

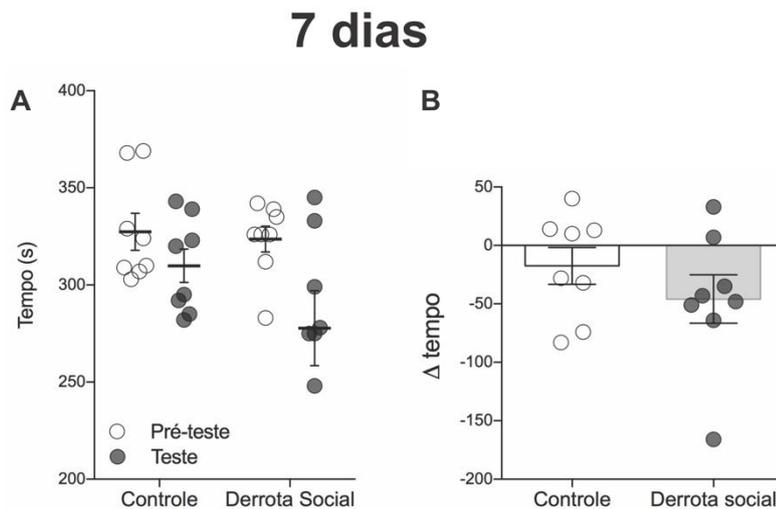
Inicialmente, usamos como condição negativa o encontro com um animal macho adulto CD1 agressivo, denominado agressor. Esses encontros foram sempre realizados no mesmo compartimento da caixa. O grupo controle não foi exposto a nenhum encontro social. Como é possível observar na figura 12A, não houve diferença entre as sessões de pré-teste e teste em ambos os grupos (Interação:  $F_{(1,14)}=1.5$ ,  $p=0.2$ ; Sessão:  $F_{(1,14)}=2.3$ ,  $p=0.1$ ; Condicionamento:  $F_{(1,14)}=1.7$ ,  $p=0.2$ ). Também não observamos diferença estatística entre os grupos na comparação de delta tempo ( $t_{(14)}=1.5$ ,  $p=0.1$ ) (Figura 12B).



**Figura 12:** Memória contextual de valência negativa induzida pela derrota social testada 24h após o condicionamento. **(A)** Tempo gasto no compartimento ausente de agressor (controle, n=8) ou contendo o agressor CD1 (Derrota social, n=8) foi realizado, antes (pré-teste) e após condicionamento (teste). **(B)** índice de aversão calculado pelo  $\Delta$  tempo (tempo teste-tempo no pré-teste).

Repetimos o teste de memória contextual 7 dias após o condicionamento. Não observamos interação entre os fatores (Interação:  $F_{(1,14)}=1.1$ ,  $p=0.3$ ) ou efeito principal do condicionamento ( $F_{(1,14)}=2.6$ ,  $p=0.1$ ). Detectamos efeito principal da sessão ( $F_{(1,14)}=5.9$ ,  $p=0.02$ ), porém o pós-teste foi ineficiente em detectar diferença entre os grupos (Figura 13A). Novamente,

não observamos diferença entre os grupos quanto ao índice de aversão ( $t_{(14)}=1$ ,  $p=0.2$ ) (Figura 13B).



**Figura 13:** Memória contextual de valência negativa induzida pela derrota social testada 7 dias após o condicionamento. **(A)** Tempo gasto no compartimento ausente de agressor (controle,  $n=8$ ) ou contendo o agressor CD1 (Derrota social,  $n=8$ ) foi realizado, antes (pré-teste) e após condicionamento (teste). **(B)** índice de aversão calculado pelo  $\Delta$  tempo (tempo teste-tempo no pré-teste).

## 7.6. Comportamentos relacionados à agressividade durante o condicionamento pela derrota social

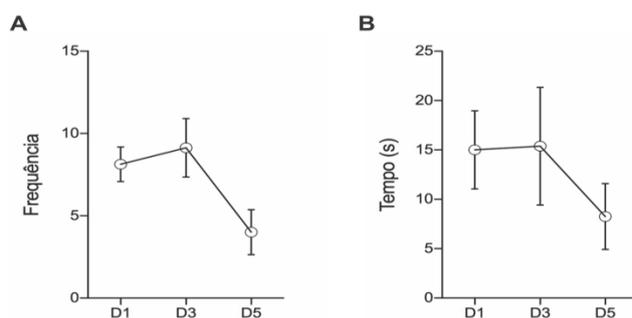
Nossos resultados mostraram que o uso da derrota social como um estímulo incondicionado para induzir memória contextual negativa foi ineficiente. Entretanto, podemos observar uma variabilidade muito grande nos dados, o que pode ter fragilizado a análise estatística para esse tamanho de amostra. Decidimos, então, quantificar comportamentos relacionados à agressividade para verificar se de fato nossos animais experimentais passaram pela derrota social. Como mostrado na figura 14, em praticamente todas as sessões de condicionamento houve agressividade por parte do agressor.

Entretanto, esses comportamentos não tiveram uma regularidade ao longo das sessões, sendo inclusive evidente, uma diminuição dos comportamentos ao longo das sessões.

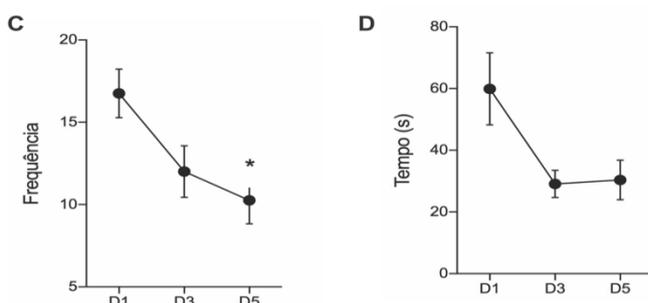
Tanto a frequência ( $F_{(1,6;11,7)}=3.5$ ,  $p=0.06$ ) (Figura 14A), quanto o tempo ( $F_{(1,5;11,1)}=1.6$ ,  $p=0.6$ ) (Figura 14B) de interação social não modificou-se estatisticamente ao longo do condicionamento. Já a frequência ( $F_{(1,9;13,3)}=4.9$ ,  $p=0.02$ ) (Figura 14C) e o tempo ( $F_{(1,6;11,3)}=5.9$ ,  $p=0.02$ ) (Figura 14D) de perseguição diminuíram ao longo das sessões, embora somente a variável frequência tenha atingido significância no teste post-hoc. Outros comportamentos como ataques ( $F_{(1,1;8,2)}=2.8$ ,  $p=0.1$ ) (Figura 14E), mordidas ( $F_{(1,4;8,6)}=2.3$ ,  $p=0.1$ ) (Figura 14E) e serpenteado de cauda ( $F_{(1,8;8,2)}=2$ ,  $p=0.1$ ) (Figura 14F) não diferiram quanto à frequência de ocorrência ao longo das sessões de condicionamento.

## Condicionamento à derrota social

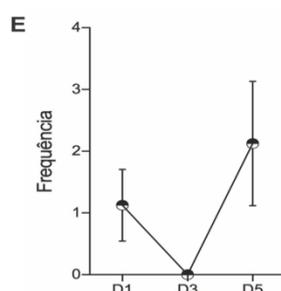
### Interação social



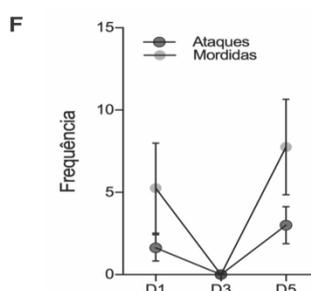
### Perseguição



### Serpenteado de cauda



### Ataque e mordida



**Figura 14:** Comportamentos relacionados à derrota social, ocorrida durante o condicionamento (D1, D2, D3) ao agressor. Frequência (A) e tempo (B) de interação social. Frequência (A) e tempo (B) de perseguição. (E) serpenteado de cauda e (F) ataques e mordidas.

### 7.7. Interação social com fêmea não induz memória contextual de valência positiva no paradigma de preferência condicionada ao lugar

Na busca por um estímulo social que fosse capaz de induzir memória contextual positiva, optamos por utilizar uma fêmea. No teste de memória realizado 24h pós condicionamento, não observamos interação entre os fatores ( $F_{(1,16)}=0.001$ ,  $p=0.9$ ), ou efeito principal da sessão ( $F_{(1,16)}=0.01$ ,  $p=0.9$ ) e do condicionamento ( $F_{(1,16)}=3$ ,  $p=0.1$ ) (Figura 15A). Também não detectamos diferença entre os grupos quanto ao índice de preferência ( $t_{(16)}=0.18$ ,  $p=0.8$ ) (Figura 15B).

Repetimos o teste 7 dias após o condicionamento, e novamente, não foi possível detectar interação entre os fatores (Interação:  $F_{(1,16)}=0.03$ ,  $p=0.8$ ) ou efeito principal da sessão ( $F_{(1,16)}=0.003$ ,  $p=0.9$ ) quanto ao tempo no compartimento condicionado. Entretanto, observamos um efeito principal do condicionamento ( $F_{(1,16)}=7.3$ ,  $p=0.01$ ), que não foi confirmado pela análise pós-hoc (Figura 16A). Não observamos diferença entre os grupos quanto ao índice de preferência ( $t_{(16)}=0.03$ ,  $p=0.9$ ).

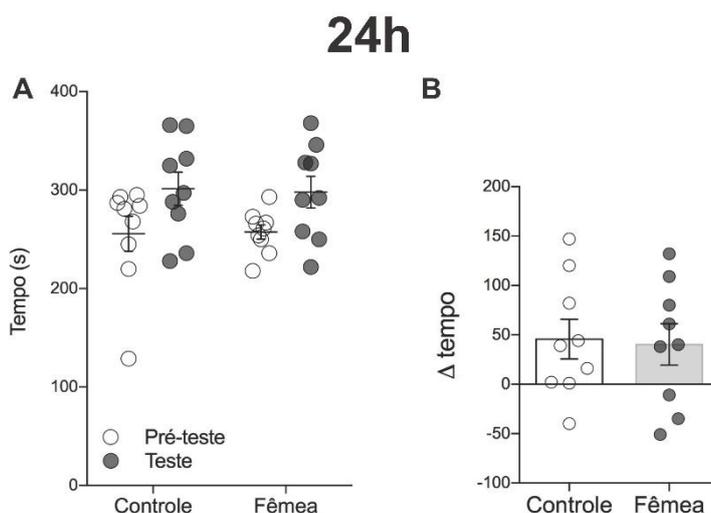


Figura 15: Memória contextual de valência positiva induzida pela interação com a fêmea testada 24h após o condicionamento. **(A)** Tempo gasto no compartimento na ausência da fêmea (controle, n=8) ou contendo a fêmea (Interação com a fêmea, n=8) foi realizado, antes (pré-teste) e após condicionamento (teste). **(B)** índice de aversão calculado pelo  $\Delta$  tempo (tempo teste-tempo no pré-teste).

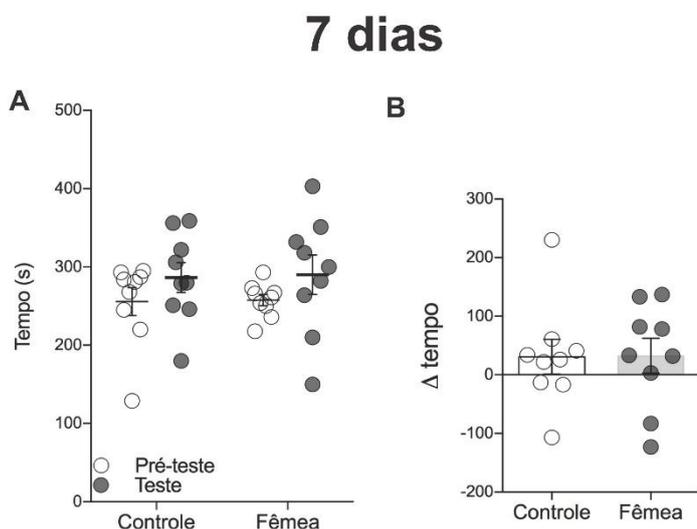


Figura 16: Memória contextual de valência positiva induzida pela interação com a fêmea testada 7 dias após o condicionamento. **(A)** Tempo gasto no compartimento ausente da fêmea (controle, n=8) ou contendo a fêmea (Interação com a fêmea, n=8) foi realizado, antes (pré-teste) e após condicionamento (teste). **(B)** índice de aversão calculado pelo  $\Delta$  tempo (tempo teste-tempo no pré-teste).

### 7.8. Comportamentos relacionados à interação com a fêmea durante o condicionamento.

Nossos resultados mostraram que o uso da interação com a fêmea como um estímulo incondicionado para induzir memória contextual positiva foi ineficiente. Entretanto, podemos observar uma diferença no tempo de exploração entre os animais teste e os controles. Há uma diferença entre os animais teste e controle em todos os dias de condicionamento (Interação  $F_{2,32}=1,56$ ;  $p=0,32$ ; Sessão  $F_{1,32}=55,22$   $p<0,0001$ ; Condicionamento  $F_{2,32}=5,39$   $p<0,01$ ). Além disso, o grupo IF apresentou uma média maior deste comportamento durante o condicionamento ( $t_{16}=7,43$   $p<0,0001$ )

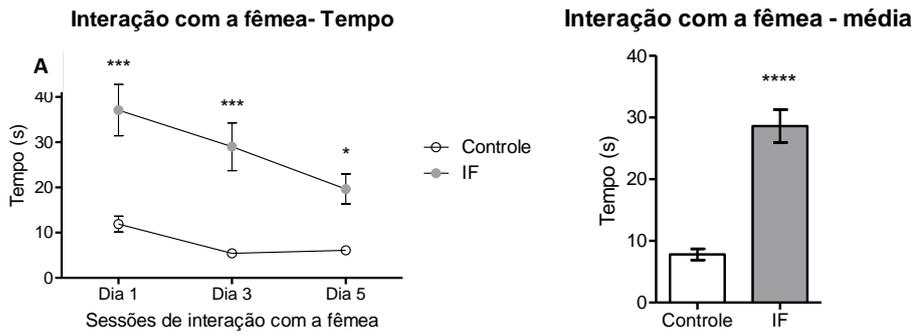


Figura 17: Tempo (A) e média dos grupos (tempo) (B) gasto pelo macho interagindo com o cilindro contendo uma fêmea, durante as sessões de condicionamento (D1, D2 e D3). \*\*\*\* $p < 0,0001$  \*\*\* $p < 0.001$  e \* $p < 0.05$  indicam diferença entre o grupo controle e IF.

## 8. Discussão

Nossos resultados indicam que é possível estabelecer memórias contextuais cujos estímulos incondicionados são odores, de valência positiva ou negativa. A estimulação monomodal olfativa, seja pelo odor de predador (TMT), ou por odores de co-específico (urina de fêmea em proestro), foi suficiente para induzir memória contextual, que persistiu por pelo menos 7 dias. Por outro lado, não foi possível induzir memória contextual, utilizando como estímulo incondicionado a interação com a fêmea ou com um macho CD1, sugerindo que estímulos mais complexos, polimodais, podem significar uma dificuldade maior de condicionar ao lugar.

Entender como os estímulos ambientais motivam e influenciam o comportamento é um dos questionamentos fundamentais da neurociência do comportamento. Essas perguntas podem ser respondidas através de diversos protocolos, como por exemplo a esQUIVA inibitória, a esQUIVA passiva, o condicionamento clássico ao contexto, entre outros. Tendo essa premissa utilizamos um paradigma de preferência/aversão condicionada ao lugar. Esse protocolo é muito estudado para entender os efeitos de drogas nos animais. No entanto, como o estímulo incondicional nesse caso é uma droga os efeitos do condicionamento e a formação da memória contextual se sobrepõem levando a uma dificuldade na interpretação dos resultados. Sendo assim, um protocolo cujo um estímulo incondicionado é mais semelhante ao encontrado na natureza auxiliaria na identificação dos mecanismos envolvidos na formação da memória associativa contextual.

Independentemente da sua valência os estímulos olfatórios são primordiais para os mamíferos, pois as pistas olfatórias estão envolvidas com diversos comportamentos, como por exemplo reconhecimento social que é de grande importância para os animais sociais (OETTL et al., 2017; SONG et al., 2016). Quanto a utilização do TMT como estímulo incondicionado tem sido explorada na literatura sua utilização no paradigma de aversão condicionada ao lugar (ENDRES & FENDT, 2007; FORTES-MARCO et al., 2015; MYERS & RINAMAN, 2005). Vários fatores podem influenciar na eficiência deste composto em induzir memória contextual. Blanchard e colaboradores não

observaram condicionamento em doses de TMT menores que 0,1µl (BLANCHARD et al., 2003). Já Fortes-Marcos e colaboradores (2015) testaram em fêmeas CD1 diferentes concentrações de TMT e visualizaram uma diferença na quantidade de tempo que o animal evitava o local onde o odor se encontrava, sugerindo que o efeito do TMT pode ser dose-dependente e concentração-dependente. As dimensões da caixa de condicionamento também influenciam. Como apontado na revisão escrita por Rosen e colaboradores (2008), quanto maior o compartimento, menor a expressão de medo (comportamento de freezing) em resposta ao TMT. Por fim, o número de compartimentos também é um fator que pode alterar o condicionamento do animal. Endres e colaboradores (2007) utilizaram ratos adultos e realizaram o condicionamento ao TMT em um aparato com 1 ou 2 compartimentos. Seus resultados mostraram que ratos não condicionam ao TMT num aparato com 1 compartimento. Nossos resultados estão de acordo com aqueles que mostraram haver condicionamento ao TMT num aparato com dois compartimentos e utilizando camundongos machos C57/BL6. Além disso, até onde sabemos, somos os primeiros a demonstrar que esta memória contextual persiste por até 7 dias, fato esse nunca antes explorado.

Analizamos diferentes comportamentos durante o condicionamento ao TMT para entendermos como o animal se comportou na presença do estímulo escolhido. O medo ao TMT parece ser inato, porém os comportamentos que o TMT elicia não são invariáveis, mudando de acordo com a necessidade que o ambiente demanda. Foi observado que na presença do TMT os animais condicionados têm a exploração vertical (*rearing*) aumentada em relação ao grupo controle apenas no primeiro dia. Foi demonstrando que a exposição de ratos ao TMT elicia um comportamento de *rearing* menor quando comparados a outros odores aversivos, como por exemplo o ácido butírico a exposição de ratos ao TMT e outros odores aversivos, como por exemplo o ácido butírico. (WALLACE & ROSEN, 2000). Porém, Blanchard e colaboradores (2003) não observaram uma diferença no comportamento de *rearing* nos ratos que foram expostos a doses baixas de TMT durante o condicionamento. O *rearing* está relacionada a ansiedade e medo, uma vez que o *rearing* é a forma que o animal recebe informações visuais, olfatórias, possivelmente auditivas e

somatossensoriais para formar um mapa do ambiente (LEVER et al, 2006). No caso do nosso paradigma o aumento do *rearing* no primeiro dia pode estar relacionado com a procura de uma saída pelo animal para fugir da possível ameaça.

O segundo comportamento estudado foi o *grooming*, onde é visto uma diferença no grupo TMT entre o dia1 x dia5. O *grooming* é uma medida de ansiedade do animal (BROWN, 2013). os dados encontrados na literatura demonstram que os animais apresentam uma taxa pequena de *grooming* quando expostos ao TMT (JANITZKY et al., 2009; WALLACE & ROSEN, 2000). No nosso estudo observamos um aumento dessa taxa, porém não encontramos resultados na literatura que corroborem com os nossos, visto que o número de artigos que utilizaram o TMT como estímulo incondicionado no condicionamento que quantifiquem o comportamento de *grooming* é escasso.

Um outro comportamento em que foi observada diferença entre os grupos foi o *freezing*. Apesar de no primeiro dia não haver diferença entre o grupo TMT e controle observamos um aumento do 3 e 5 desse comportamento no grupo TMT. Esse comportamento é bem demonstrado nos estudos realizados com o TMT (AYERS et al., 2013; ENDRES & FENDT, 2007; TAUGHER et al., 2015; WALLACE & ROSEN, 2000). O *freezing* é um comportamento passivo e é analisado em diversos estudos que realizam o condicionamento clássico ao contexto e a pistas (ABRAHAM et al., 2017; ALVES et al., 2016; FEAR-CONDITIONING et al., 2018; LEI et al., 2017) Os dados vistos por WALLACE & ROSEN (2000) corroboram com os nossos, pois não é visto a habituação ao TMT do animal ao condicionamento, ou seja, uma diminuição da quantidade de *freezing* durante o protocolo.

Observando os três parâmetros vimos que no primeiro dia o animal parece estar com uma resposta ativa de medo, com o aumento do *rearing*. Nos outros dias parece haver uma troca para uma resposta passiva de medo com o aumento do comportamento de *grooming* e de *freezing*. Portanto, demonstramos que o nosso protocolo foi capaz de induzir a formação de memórias contextuais utilizando o TMT como estímulo incondicionado e sabemos, intuitivamente, que as memórias negativas persistem por um tempo

maior nos animais, pois geralmente são memórias que são remetidas a situações de riscos ou algo desagradável. Nossos resultados demonstram que após a segunda sessão de teste, 7 dias após o condicionamento, os animais continuam tendo aversão ao contexto condicionado, mostrando assim que essa memória persiste por pelo menos 7 dias. Estudos comparando a persistência de diferentes memórias com valências opostas são escassos e não encontramos na literatura nenhum estudo que tenha utilizado o TMT para estudar a persistência da memória, tornando difícil a comparação do nosso trabalho com outros previamente executados. Porém, se buscarmos por trabalhos utilizando outros estímulos com valência negativa, como por exemplo Qi e colaboradores (2018), que utilizaram a derrota social como estímulo incondicionado, temos que o comportamento de *freezing* extingue na 4ª sessão de extinção que ocorre 15 dias após o condicionamento. De forma similar, no nosso laboratório, foi demonstrando que a memória de medo contextual persiste por mais de 7 dias (PEREIRA et al, dados não publicados). Wandell e colaboradores (2004) realizaram o condicionamento ao medo utilizando como pista um som e observaram diferenças após 4 sessões de extinção entre duas linhagens de camundongos, C57Bl/6J e DBA/2J. Oliver e colaboradores (2018) observaram diferenças entre os sexos após 5 sessões da extinção da memória contextual de medo durante a administração aguda e crônica de nicotina. O estímulo incondicionado mais empregado no estudo da extinção da memória é o choque nas patas (BOUTON & TODD, 2015). No caso do nosso estudo, estamos lidando com um estímulo inato (odor do predador), que implica na formação de uma memória essencial para sobrevivência do indivíduo, porém são necessários mais estudos para entender porque essa memória persiste por 7 dias.

O segundo estímulo olfatório utilizado foi a urina de fêmeas em proestro como estímulo social positivo. O processamento da informação presente na urina da fêmea é estudado para entender como ocorre o processamento da identificação de co-específicos (BEN-SHAUL et al., 2010; BERGAN et al, 2014). Porém a urina é utilizada também como um estímulo para o condicionamento, Roberts e colaboradores (2012) utilizaram fêmeas, o

protocolo de CPP e como estímulo eles utilizaram a urina de machos. Eles observaram que a memória contextual dessas fêmeas persiste por até 28 dias.

Foram quantificados os tempos que o animal teste e o controle interagiam com o papel filme umidificado com a urina de fêmea ou salina. Os animais exploraram mais a urina em relação a salina. Como também há uma diferença entre a média da frequência total de exploração entre os controles e os animais teste. Malkesman e colaboradores (2010) desenvolveram um protocolo chamado de teste para cheirar a urina da fêmea (do inglês FUST, *female urine sniffing test*) e analisaram diferentes linhagens, compararam o tempo de exploração da urina e água, a vocalização, a ativação da NAc e chegaram à conclusão que a urina da fêmea pode ser utilizada como um estímulo de recompensa em roedores. Porém, esse protocolo desenvolvido por esse grupo ainda não é muito utilizado. Berger e colaboradores (2012) utilizaram o protocolo do FUST para testar os camundongos TACR1<sup>-/-</sup>. Esses receptores deplecionados influenciam na agressividade, depressão e ansiedade. Foi demonstrado que eles também afetam o comportamento sexual, pois os animais selvagens exploram mais a urina da fêmea do que os knockouts. A urina da fêmea no protocolo de FUST foi utilizado por Malkesman e colaboradores (2012) para analisar o comportamento tipo depressivo em animais. Os animais depressivos exploram menos a urina de fêmea, o que é revertido com o tratamento de D-serina e ketamina. Demonstrando que utilizar protocolos com urina de fêmea pode ser um bom estímulo para analisar comportamentos motivados e de recompensa em roedores. Contudo, não achamos trabalhos que analisem a quantidade de interação com odor urina de fêmea em trabalhos que envolvem o condicionamento do animal a uma memória contextual, sendo assim, o nosso protocolo parece ser promissor para essa abordagem.

O nosso segundo resultado de estímulo social com valência negativa é a derrota social. O estresse social induzido por esse protocolo é estudado de diversas formas. Kinsey e colaboradores (2007) estudaram se a exposição crônica a derrota social eliciava nos animais comportamentos tipos depressivo e ansioso. Keeney et al (2006) testou diferenças do estresse da derrota social de forma aguda e crônica na liberação de hormônios do eixo Hipotálamo-

Pituitária-Adrenal e do papel da serotonina do hipocampo. Eles observaram que maior liberação de corticosterona ocorre após 12 derrotas sociais. Esse efeito é duradouro, mesmo 9 dias após a derrota os animais apresentam fenótipo tipo depressivo no teste do nado forçado. Crestani e colaboradores (2018) pesquisaram a diferença entre interações agressivas e não agressivas em um contexto. Os animais que passaram pelo encontro agressivo realizaram mais grooming na caixa que ele habita (do inglês, *home cage*) do que no contexto onde teria ocorrido o encontro agressivo, sugerindo que os animais evitaram o contexto onde ocorreu a derrota social. Para estudar melhor a derrota social Faturi e colaboradores (2013) tentaram mapear a circuitaria que envolve a expressão do medo contextual a derrota social, eles analisaram atividade exploratória, risk assessment, freezing, grooming e rearing, eles observaram que quando o contexto possuía a maravalha suja do animal que era o dominante os ratos realizavam mais o risk assessment e freezing e diminuía o rearing e a exploração, eles também realizaram um cFos para identificar as regiões que eram ativadas durante a rerepresentação ao contexto e eles observaram que a porção dorsolateral do núcleo dorsal premamilar (PMDdm) possuía uma alta ativação e por ser uma região importante para comportamentos inatos eles bloquearam essa região com muscimol e obtiveram o resultado no qual é visto uma diminuição do freezing e risk assessment e aumento da exploração em comparação ao salina, eles também bloquearam a PAG, pois é uma região importante para o output de respostas ao medo, nos seus resultados eles demonstraram que o freezing é 0, há uma diminuição do risk assessment e um aumento da taxa de exploração. Golden e colaboradores (2011) publicaram um protocolo sobre a derrota social que acarretava estresse nos animais, nesse protocolo eles utilizam os mesmos animais que nos utilizamos, um C57Bl/6 como animal teste e o CD1 como um co-específico violento, porém para esse protocolo funcionar os autores dizem que é necessário de 3-4 semanas de condicionamento, diferente do nosso que durou 6 dias, talvez um dos porquês do nosso protocolo não ter funcionado. ou seja, esse estímulo não foi suficiente para formar uma memória contextual nos animais teste. Se observarmos o resultado (Fig 6) atentamente verificamos que alguns animais foram condicionados, porém, como grupo os animais não foram. Outros fatores vistos no protocolo de Golden e colaboradores (2011)

foram que o screening realizados por eles foram de mais de 3 dias, os CD1 não tinham mais de 10 semanas, eles utilizaram um CD1 para cada encontro de derrota social, dentre outros fatores. Comparando com outros estudos o nosso protocolo é novo e diferente dos demais, pois tentamos realizar um protocolo de derrota social num aparato de aversão ao lugar, devemos levar em consideração que o protocolo para um residente habituar com o local demora muitos dias e que os protocolos são diversos para encontrar um que funcione.

Um outro motivo para o estímulo não ter funcionado foi o fato desse estímulo ser polimodal, ou seja, são muitos estímulos sensoriais para o animal processar e conseguir formar um engrama daquele ambiente. Um estímulo polimodal é aquele que integra mais de uma via sensorial, no nosso protocolo envolvia as vias do olfato, somatossensorial e visual. Pourtois e colaboradores (2012) na sua revisão demonstram os mecanismos neurais que influenciam a percepção e conseqüentemente a formação da memória que depende do estímulo, mas também do seu processamento. Eles atribuem 4 variáveis para essa percepção: fatores exógenos (estímulos), endógenos (motivação), forma que o indivíduo teste se encontra (do inglês, *object-based*) (agrupados) e emocionais que interagem entre si e resulta na percepção. Alguns dessas variáveis pode não ter sido estimulada suficientemente para formar um engrama e não ter ocorrido a formação da memória contextual.

Assim como realizado nos estudos com TMT, também analisamos alguns comportamentos durante o condicionamento da derrota social. Os comportamentos foram escolhidos devido a sua importância para o comportamento de agressividade dos animais, e observamos apenas uma diferença no comportamento de perseguição e apenas para a frequência. Esses resultados não nos ajudam a explicar porque não ocorreu o condicionamento pelos animais, porém, quando observamos os comportamentos agonísticos (mordida, ataque e serpentear de cauda) notamos que no segundo dia na presença do coespecífico violento não houve nenhum desses comportamentos, um motivo por que os animais não condicionaram devido à falta de estímulo aversivo nesse dia.

Por fim, temos o ultimo estímulo social que é a interação com uma fêmea intacta. No caso da IF foi visto que o estímulo não é capaz de formar uma memória contextual. Alguns grupos utilizaram a interação com a fêmea nos seus experimentos, como por exemplo, Ramirez e colaboradores (2015) utilizaram a interação com a fêmea como estímulo para formar uma memória positiva seria evocada utilizando optogenética posteriormente. Redondo e colaboradores (2014) utilizaram o paradigma de preferência condicionada ao lugar e como estímulo positivo utilizaram a fêmea. Bell e colaboradores (2010) utilizaram a recompensa sexual, eles utilizaram o comportamento sexual e a secreção vaginal como os estímulos no protocolo de CPP e conseguiram condicionar o macho a uma preferência pelo compartimento onde a fêmea estava. Eles utilizaram hamsters machos e fêmeas ovariectomizadas e tratadas com estradiol e progesterona, 6 sessões, sendo 3 com o estímulo e 3 sem o estímulo por 30 min cada. O encontro com a fêmea pode ser um estímulo para medir comportamentos motivacionais e comportamentos de recompensa, Ago e colaboradores (2015) utilizaram o encontro com a fêmea como estímulo para validar um modelo de comportamento de recompensa e motivacional em camundongos, eles realizaram os testes em 5 linhagens diferentes, o protocolo consistia num aparato com 3 compartimentos onde o animal teste permanecia no meio e nos outros 2 compartimentos eram colocados um macho e uma fêmea e o animal teste interagia com ambos e era mensurado a quantidade de tempo dessa interação. A maioria das linhagens preferem a interação com a fêmea em relação a interação com o macho.

Uma explicação para a não persistência da memória contextual pode ser a mesma para a derrota social, pois temos um estímulo polimodal que tenha atrapalhado na hora do condicionamento. Outro fator pode ser o ciclo estral da fêmea, pois sabemos que as fêmeas ficam receptivas no final do proestro. Porém, Ago e colaboradores (2015) refuta essa ideia, pois, para dar mais suporte ao seu novo modelo testaram em animais CD1 a preferência entre machos e fêmeas em diferentes fases do seu ciclo, eles observaram que em todas as fases os machos preferiram sempre o compartimento com a fêmea, porém quando a fêmea foi castrada não a diferença entre a preferência da zona onde o macho ou a fêmea se encontram, outro fator analisados por esse

grupo foi a idade do animal teste, quando os animais possuem 3, 5 ou 40 semanas não existe diferença na preferência entre a zona com o macho ou a fêmea, todas as outras idades analisadas o animal teste prefere a zona com a fêmea.

Para perspectivas futuras e a continuação do trabalho pode ser investigado alguns fatores, tais quais, manipular como ocorre o processamento dos estímulos escolhidos e descobrir se estão envolvidos com a formação da memória, uma das formas de entender a formação da memória é estudando a razão dos receptores AMPA/NMDA para relacionar com os processos moleculares que ocorrem na LTP. Foi observado estudos que demonstram diferença entre linhagens, com isso se faz necessário procurar se há diferença entre as mesmas nos protocolos empregados.

O estímulo sensorial mais importante para os roedores é o olfato e os nossos dados corroboram com essa observação. A informação, dependendo do estímulo, tem seu input pelo sistema olfatório principal ou acessório, ou ambos, porém, para todos os estímulos sociais estudados possuem sua projeção para a amígdala cortical (HASHIKAWA et al., 2017; ROOT & DENNY, 2014), e a partir dessa região é observada projeções para o BNST (anterior, posterolateral e núcleo transversal), MeA (posterodorsal e anterior), CeA, ventral subiculum (SUBv), parte ventral do septum lateral (LSv), substância inominada (SI), núcleo accumbens (NAc) e a área infralímbica (CANTERAS et al, 1992), sendo essa região uma importante área para estudar como o processamento da informação dos estímulos podem afetar a formação da memória.

Uma outra perspectiva de um futuro projeto é analisar as diferenças em diferentes protocolos com diferentes linhagens, pois alguns autores observaram diferenças entre as linhagens e o tempo de exposição do TMT, Rosen e colaboradores (2006) realizaram testes com 3 linhagens diferentes de ratos e chegaram ao resultado que todos os animais percebem e evitam o TMT, porém a linhagem Wistar possui uma resposta menor a esse estímulo. Como discutido diferentes protocolos eliciam comportamentos diferentes, e a premissa do estudo do comportamento é entender como o ambiente influencia o animal teste, sendo assim se faz necessário entender como uma exposição

mais longa, por mais dias, influenciaria no comportamento do animal. Sendo necessário a verificação se ocorre um comportamento semelhante com protocolos diferentes em linhagens de camundongos que estão disponíveis para realizar pesquisas é de suma importância para validar o protocolo e o estímulo.

Empiricamente, o humor dos indivíduos interfere na persistência de memórias, sendo que em geral, estados de ânimo negativos, tendem a favorecer a persistência de memórias negativas (Curci et al, 2013; Careaga et al, 2016). Uma das maneiras de induzir um estado de ânimo negativo em roedores se dá através do isolamento social (Guarnieri et al., dados não publicados de nosso laboratório). De fato, sabe-se que o isolamento social altera o armazenamento de memórias (Gusmão et al., 2012; Monteiro et al., 2014), induz comportamentos depressivos e de ansiedade (Guarnieri et al., dados não publicados de nosso laboratório), além de exacerbar a agressividade (Oliveira et al., dados não publicados de nosso laboratório). Temos como exemplo a mudança do estado interoceptivo influenciado na memória social e no reconhecimento de objeto. Lander e colaboradores (2017) estudaram o isolamento social em diferentes idades, animais na adolescência (38 dias de vida) e na fase adulta (60 dias de vida) foram isolados por 3 semanas e passaram pelos protocolos de reconhecimento de objeto e preferência social, em ambos os testes apenas os animais na adolescência exploraram mais o objeto novo e possuíam uma preferência social pelo macho no cilindro do que o cilindro vazio, já os animais adultos não foi visto diferença significativa nos 2 testes para os protocolos de reconhecimento de objeto e preferência social. Com isso, acreditamos que esse estado interoceptivo também pode influenciar no tempo de extinção da memória contextual pareada com os estímulos sociais utilizados no nosso paradigma. Sendo os estímulos com valência negativa mais difíceis de serem extinguidos.

Por fim, estudar a valência dos estímulos se faz necessário para entender como ocorre o processamento dos estímulos, porque quando temos uma patologia esse processamento se dá de maneira errônea, sendo assim como trabalhamos com modelos animais poderia ser útil entender como ocorre

a valência do processamento de estímulos sociais referentes ao nosso modelo. Se sabe que algumas regiões processam ambas os estímulos, como por exemplo a amígdala cortical, contudo não se sabe que subpopulações são necessárias para processar diferentes estímulos, sendo assim, necessário elucidar esses mecanismos para entender como ocorre a percepção de um predador, possível parceiro sexual ou apenas a interação social entre ele.

## **9. Conclusão**

Podemos concluir que o nosso protocolo funciona, onde utilizamos um aparato com dois compartimentos na luz vermelha, estímulos sociais positivos e negativos (TMT, IU, DS e IF) em um condicionamento com um dia de habituação, 6 dias de condicionamento e o teste. Foi visto que estímulos olfatórios pareados ao contexto são capazes de induzir a formação de uma memória contextual, porém, quando os estímulos são polimodais não observamos essa memória.

Esse protocolo serve como perspectiva para utilização desse paradigma no conhecimento sobre a valência de estímulos sociais e sua utilização como estímulos incondicionados na formação de memórias contextuais. A partir desse paradigma pode-se fazer útil o uso de ferramentas farmacológicas e genéticas para manipulação das vias ativadas nesses estímulos, como por exemplo o sistema defensivo do hipotálamo ventromedial e da amígdala cortical, áreas importantes para o processamento dos estímulos estudados.

Esses achados podem ser empregados no futuro para o conhecimento de como os modelos animais podem ajudar cada vez mais a entender doenças como estresse pós-traumático, depressão, bipolaridade, entre outras. Doenças onde a formação de determinadas memórias ocorre de forma desordenada.

E entender o processamento desses estímulos sociais pode ajudar a elucidar melhores modelos animais para que os modelos sejam mais semelhantes as experiências vividas pelo homem.

## 10. Referências Bibliográficas

ABRAHAM, A. D. et al. Effects of D1 receptor knockout on fear and reward learning. **Neurobiol. Learn Mem.**, v.133, 265–273, 2016.

AKERS, K. G. et al. Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. **Science**, v.344, 598 – 602, 2014.

ALVES, E. et al. Epinephrine increases contextual learning through activation of peripheral  $\beta$  2 -adrenoceptors. **Psychopharmacology**, v. xx, xx-xx 2016.

AREDA, T., et al. Cat odour exposure decreases exploratory activity and alters neuropeptide gene expression in CCK2 receptor deficient mice, but not in their wild-type littermates. **Behavioral Brain Research**, v. 169, 212-219, 2006.

AYERS, L. W. et al. Freezing to the predator odor 2,4,5 dihydro 2,5 trimethylthiazoline (TMT) is disrupted by olfactory bulb removal but not trigeminal deafferentation. **Behavioural Brain Research**, v. 253, p. 54–59, 2013.

BEACH, H. D. Morphine addiction in rats. **Can J Psychol.**, v.11, 104-112, 1957.

BEKINSCHTEIN, P. et al. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, v.53, 261-77, 2007.

BEKINSCHTEIN, P. et al. Persistence of long-term memory storage: new insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. **Neurotox Res**, v.18 , 377-85, 2010.

BEN-SHAUL, Y. et al. In vivo vomeronasal stimulation reveals sensory encoding of conspecific and allospecific cues by the mouse accessory olfactory bulb. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 107, n. 11, 2010.

BERGAN, J. F.; BEN-SHAUL, Y.; DULAC, C. Sex-specific processing of social cues in the medial amygdala. *Elife*, p. 1–22, 2014.

BLANCHARD, D. C. et al. Failure to produce conditioning with low-dose trimethylthiazoline or cat feces as unconditioned stimuli. **Behavioral Neuroscience**, v. 117, n. 2, p. 360–368, 2003.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: Some reflections on stress and emotion. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 8, p. 1177–1185, 2003.

BLANCHARD, R. J., et al. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 25, 587-595, 2001.

BOUTON, M. E.; TODD, T. P. A fundamental role for context in instrumental learning and extinction. **Behav. Process.**, v.0, 13–19, 2014.

BROWN, R. E. What are We Measuring When We Test Strain Differences in Anxiety in Mice? **Behav. Genet.**, v.43, 34–50, 2013.

BUCCAFUSCO JJ, editor. Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. 2nd edition. **Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis**; 2009.

CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.71, 481-491, 2002.

CAREAGA, M.B.; GIRARDI, C.E. & SUCHECKI, D. Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation. **Neurosci. Biobehav.**, 71, 48 – 57, 2016.

CHAU, L. S. et al. Neurobiology of Learning and Memory Elevated Arc / Arg 3 . 1 protein expression in the basolateral amygdala following auditory trace-cued fear conditioning. **Neurobiology of learning and memory**, v. 106, p. 127–133, 2013.

CALCAGNETTI, DJ. & SCHECHTER, MD. Nicotine place preference using the biased method of conditioning. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, 18, 925-33,1994

CRUMP, D. R. Thietanes and dithiolanes from the anal gland of the stoat (*Mustela erminea*). **J. Chem. Ecol.** 6, 341–347, 1980.

CURCI, A.; LANCIANO, T.; SOLETI, E. & RIMÉ, B. Negative emotional experiences arouse rumination and affect working memory capacity. **Emotion**, 13, 867 – 880, 2013

DUKAS, R. Evolutionary biology of insect learning. **Annu. Rev. Entomol.** v.53, 145-160, 2008.

DULAC. C & TORELLO, A. T. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. **Nature reviews Neuroscience**, v.4, 551-562, 2003.

ENDRES, T. & FENDT, M. Aversion- vs fear-inducing properties of 2,4,5-trimethyl-3-thiazoline, a component of fox odor, in comparison with those of butyric acid. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, 2324-2327, 2009.

ENDRES, T. & FENDT, M. Conditioned behavioral responses to a context paired with the predator odor trimethylthiazoline. **Behavioral Neuroscience**, v. 121, 594-601, 2007

ENDRES, T.; FENDT, M. Conditioned behavioral responses to a context paired with the predator odor trimethylthiazoline. **Behavioral neuroscience**, v. 121, n. 3, p. 594–601, 2007.

FEAR-CONDITIONING, T. et al. Learning and Memory is Modulated by Cannabidiol When Administered During Trace Fear-Conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, 2018.

FORTES-MARCO, L. et al. Avoidance and contextual learning induced by a kairomone, a pheromone and a common odorant in female CD1 mice. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. OCT, p. 1–13, 2015.

GOLDEN, S. A.; COVINGTON, H. E.; BERTON, O. & RUSSO, S. J. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature protocols**, v. 6, 1183-1191, 2011.

GUARRACI, F. A.; BOLTON, J. L. "Sexy stimulants": The interaction between psychomotor stimulants and sexual behavior in the female brain. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 2013.

GUSMAO, I. D. et al. Odor-enriched environment rescues long-term social memory, but does not improve olfaction in social isolated adult mice. **Behavioural Brain Research**, 228, 440–446, 2012.

HACQUEMAND, R.; CHOFFAT, N.; JACQUOT, L. & BRAND, G. Comparison between low doses of TMT and cat odor exposure in anxiety- and fear-related behaviors in mice. **Behavioral Brain Research**, v. 238, 227-231, 2013.

HASHIKAWA, K.; HASHIKAWA, Y.; FALKNER, A. & LIN, D. The neural circuits of mating and fighting in male mice. **Cur.opin Neurobiol.**, v.38 27-27, 2017.

HEBB, D. O. The organization of behavior; a neuropsychological theory. **Wiley, New York**, 1949.

HEINRICHS, S. C. et al. Dendritic structural plasticity in the basolateral amygdala after fear conditioning and its extinction in mice. **Behav. Brain Res.**, v. 248, 80–84, 2013.

HOLAHAN, M. R.; WHITE, N. M. Intra-Amygdala Muscimol Injections Impair Freezing and Place Avoidance in Aversive Contextual Conditioning. **Learning and Memory**, v. xx, 436–446, 2004.

JAMES, W. The principles of Psychology, 1890.

JANITZKY, K. et al. Behavioral effects and pattern of brain c-fos mRNA induced by 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, a component of fox feces

odor in GAD67-GFP knock-in C57BL / 6 mice. **Behavioural Brain Research**, v. 202, 218–224, 2009.

JANITZKY, K.; D'HANIS, W.; KROBER, A. & SCHWEGLER, H. TMT predator odor activated neural circuit in C57BL/6j mice indicates TMT-stress as suitable model for uncontrollable intense stress. **Brain Research**, v. 1599, 1-8, 2015.

JIANG, L. et al. Cholinergic signaling controls conditioned-fear behaviors and enhances plasticity of cortical-amygdala circuits. **Neuron** v. 90, 1057–1070, 2016.

KATCHE, C.; CAMMAROTA, M. & MEDINA, J. H. Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage. **Neurobiol Learn Mem**, v.106, 40 – 47, 2013.

KEENEY, A. et al. Differential effects of acute and chronic social defeats stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v.18, 330-338, 2006.

KENNEY, J. W.; RAYBUCK, J. D. & GOULD, T. J. Nicotinic receptors in the dorsal and ventral hippocampus differentially modulate contextual fear conditioning. **Hippocampus**, v.22, 1681-1690, 2012.

KINSEY, S. G. et al. Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function in C57BL/6 and CD-1 mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.21, 458-466, 2007.

KITAMURA, T. et al. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. **Science**, v.356 73-78, 2017.

KUTLU, M. G.; ORTEGA, L. A. & GOULD, T. J. Strain-dependent performance in nicotine-induced conditioned place preference. **Behav. Neurosci.**, v.129, 37-41, 2015.

LEAL, G.; AFONSO, P. M.; SALAZAR, I. L. & DUARTE, C. B. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. **Brain Res.**, v.1621, 82-101, 2015.

LEI, A. M. et al. Contextual fear conditioning is enhanced in mice lacking functional sphingosine kinase 2. **Behavioural Brain Research**, 2017.

LEVER, C.; BURTON, S.; KEEFE, J. O. Rearing on Hind Legs , Environmental Novelty , and the Hippocampal Formation. **Reviews in the Neurosciences**, v. 17, 111–133, 2006.

MATSUMOTO, Y. K.; OKANOYA, K. Phase-Specific Vocalizations of Male Mice at the Initial Encounter during the Courtship Sequence. **Plos One**, 1–16, 2016.

MISANE, I. et al. GABA A receptor activation in the CA1 area of the dorsal hippocampus impairs consolidation of conditioned contextual fear in C57BL / 6J mice. **Behavioural Brain Research**, v. 238, p. 160–169, 2013.

MONKS, D. A. Conflict of interest statement: The authors declare no conflict of interest . **Frontiers in Neuroendocrinology**, 2017.

MORRIS, R. G. & FREY, U. Hippocampal synaptic plasticity: role in special learning or the automatic recording of attended experience? **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.**, v.352, 1489-1503, 1997.

MUÑOZ-ABELLÁN, C. et al. Cat odor cause long-lasting contextual fear conditioning and increased pituitary-adrenal activation, without modifying anxiety. **Hormones and Behavior**, v. 56, 465-471, 2009.

MYERS, E. A; RINAMAN, L. Trimethylthiazoline supports conditioned flavor avoidance and activates viscerosensory, hypothalamic, and limbic circuits in rats. American journal of physiology. **Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 288, n. 6, p. R1716-26, 2005.

MYERS, K.M. & DAVIS, M. Mechanisms of fear extinction. **Molecular Psychiatry** v.12, 120-150, 2007.

NAMBURI, P. et al. A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. **Nature**, v.520, 675-678, 2015.

Nolte, D. L., Mason, J. R., Epple, G., Aronov, E., and Campbell, D. L. What are predator urines aversive to prey? **J. Chem. Ecol.** 20, 1505–1516, 1994.

OETTL, L. et al. Oxytocin enhances social recognition by modulating cortical control of early olfactory processing. **Neuron**, v. 90, 609–621, 2017.

PANKSEPP, J. & PANKSEPP, J. B. Toward a cross-species understanding of empathy. **Trends in neuroscience**, v 36, xx-xx, 2013.

QI, C-C, et al. Interaction of basolateral amygdala, ventral hippocampus and medial prefrontal cortex regulates the consolidation and extinction of social fear. **Behavioral and Brain Function**, v.14, 1-13, 2018.

RAMIREZ, S. et al. Activating positive memory engrams suppresses depression-like behavior. **Nature**, v.522, 335-339, 2015.

REDOLFI, N. & LODOVICH, C. Role of the odorant receptor in neuronal connectivity in olfactory bulb. **Swiss medical weekly**, v.145 1-12, 2015.

REDONDO, R. L. et al. Bidirectional switch of the valence associated with hippocampal contextual memory engram. **Nature**, v.513, 426-430, 2014.

RISINGER, F.; OAKES, R. A. Nicotine-Induced Conditioned Place Preference and Conditioned Place Aversion in Mice. **Pharmacology Biochem. And Beh.**, v. 51, 457–461, 1995.

ROBERTS, S. A. et al. Pheromonal induction of spatial learning in mice. **Science**, v.338, 1562-1465, 2012.

ROOT, C. M.; DENNY, C. A. The participation of cortical amygdala in innate, odour-driven behaviour. **Nature**, v. 515, 269-273,2014.

ROOT, C. M.; DENNY, C. A.; HEN, R. & AXEL, R. The participation of cortical amygdala in innate, odour-driven behavior. **Nature**, v. 515, 269-273, 2014.

ROSEN, J. B.; ASOK, A. & CHAKRABORTY, T. The smell of fear: innate threat of 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, a single molecule component of a predator odor. **Frontier in Neuroscience**, v.9, 1-12, 2015.

ROSEN, J. B.; PAGANI, J. H.; ROLLA, K. L. G. & DAVIS, C. Analysis of behavioral constraints and the neuroanatomy of fear to the predator odor trimethylthiazoline: A model for animal phobias. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.32, 1267-1276, 2008.

ROSSI, N. A. & REID L. D. Affective states associated with morphine injections. **Physiol. Psychol.**, v.4, 269-274, 1976.

SACHSER, R. M. et al. Forgetting of long-term memory requires activation of NMDA receptor, L-type voltage-dependent Ca(2+) channels, and calcineurin. **Science Rep.** v.6 227-271, 2016.

SAITO, H., et al. Immobility responses are induced by photoactivation of single glomerular species responsive to fox odour TMT. **Nature Communications**, v. 8, 1-10, 2017.

SHEMESH, Y. et al. High-order social interactions In groups of mice. **Elife (Cambridge)**, 2, e00759, 2013.

SILVA, B. A.; GROSS, C. T. & GRAFF, J. The neural circuits of innate fear: detection, integration, action, and memorization. **Learning and memory**, v.23, 544-555, 2016.

SONG, Z. et al. Oxytocin (OT) and arginine-vasopressin (AVP) act on OT receptors and not AVP V1a receptors to enhance social recognition in adult Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Hormones and Behavior**, v.81, 20-27, 2016.

SWIFT-GALLANT, A. & MONKS, D.A. Androgenic mechanisms of sexual differentiation of nervous system and behavior. **Frontiers in neuroendocrinology**, v.x, xx-xx, 2017.

TAKAHASHI, L. K.; NAKASHIMA, B. R.; HONG, H. & WATANABE, K. The smell of danger: A behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 29, 1157-1167, 2005.

TAUGHER, R. J. et al. ASIC1A in the bed nucleus of the stria terminalis mediates TMT-evoked freezing. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, n. July, p. 239, 2015.

VERMA, D. et al. Neuropharmacology NPY Y2 receptors in the central amygdala reduce cued but not contextual fear. **Neuropharmacology**, v. 99, p. 665–674, 2015.

Vernet-Maury E. Trimethyl-thiazoline in fox feces: a natural alarming substance for the rat. In: van der Starre H, editor. Olfaction and taste, vol. 7. **Washington7 IRL Press**. p. 407, 1980.

WALLACE, K. J.; ROSEN, J. B. Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox feces. **Behavioral neuroscience**, v. 114, n. 5, p. 912–922, 2000.

WANG, F.; KESSELS, H. W. & HU, H. The mouse tha roared: neural mechanisms of social hierarchy. **Trends in neuroscience**, v.37 674-682, 2014.

WANG, M. E. et al. Differential roles of dorsal and ventral hippocampus in predator odor contextual fear conditioning. **Hippocampus**, v. 23 451-466, 2013.

YANG, T. & SHAH, N. M. Molecular and neural control of sexually dimorphic social behaviors. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v.38, 89–95, 2016.