

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

HARRISON THOMASON SANTERO

**TÔNUS INIBITÓRIO DA REGIÃO CA2 DO HIPOCAMPO NA MEMÓRIA
SOCIAL DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS**

Belo Horizonte

2023

Harrison Thomason Santero

**TÔNUS INIBITÓRIO DA REGIÃO CA2 DO HIPOCAMPO NA MEMÓRIA SOCIAL
DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira

Belo Horizonte

2024

- 043 Santero, Harrison Thomason.
Tônus inibitório da região CA2 do hipocampo na memória social de camundongos machos e fêmeas [manuscrito] / Harrison Thomason Santero. – 2024.
72 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.
1. Fisiologia. 2. Isolamento Social. 3. Região CA2 Hipocampal. 4. Caracteres Sexuais. 5. Memória. I. Moraes, Grace Schenatto Pereira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 585 DE HARRISON THOMASON SANTERO

"Tônus Inibitório da Região CA2 do Hipocampo na Memória Social de Camundongos Machos e Fêmeas"

HARRISON THOMASON SANTERO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **29 de fevereiro de 2024**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Victor Rodrigues Santos, ICB/UFMG

Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini, ICB/UFMG

Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes, Orientadora ICB/UFMG

Belo Horizonte, 29 fevereiro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Grace Schenatto Pereira Moraes, Professora do Magistério Superior**, em 15/03/2024, às 12:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Maristela de Oliveira Poletini, Professora do Magistério Superior**, em 22/04/2024, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Victor Rodrigues Santos, Professor(a)**, em 11/07/2024, às 17:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3111401** e o código CRC **35BA0C67**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG que financiaram e possibilitaram este trabalho. À UFMG e à PGFisFar pelas oportunidades oferecidas.

À minha orientadora Prof^a Grace Schenatto Pereira Moraes, por me aceitar em seu grupo de pesquisa e fornecer meios para desenvolver o trabalho. Aos outros professores Márcio Flávio Dutra Moraes e André Ricardo Massensini que também são membros do Núcleo de Neurociências pelos ensinamentos e contribuições nesta pesquisa.

Ao Grace Team de modo geral, Matheus, Caio, Elisa, Flávia, Eliane, Paula, Lara Mansk, Léo, João Victor e Lara Azevedo pelas discussões, cafés, apoio, cumplicidade e amizade. Em especial, agradeço ao Caio, Léo, Elisa, Paula e João Victor pela ajuda durante os experimentos e pela companhia. Vocês tornaram todo o processo muito mais leve e prazeroso. Eu admiro muito vocês, foi um prazer poder compartilhar um pouco da caminhada na ciência com vocês.

Aos demais colegas do NNC, agradeço pelo ambiente estimulante do laboratório, pelos lanches, aprendizados e festas. Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que contribuíram para a realização desta dissertação. Este trabalho não teria sido possível sem o apoio e a orientação valiosa de muitas pessoas incríveis.

Não poderia deixar de agradecer de forma especial ao Léo, João Pedro, Elisa, Caio, Paula e Flávio pela sua generosidade e companheirismo. Esse trabalho é fruto de uma construção coletiva da qual vocês são parte substancial. Eu vou levar um pouco de cada um de vocês comigo. As mudanças que vocês promoveram na minha vida vão para muito além da academia.

Sou grato também a todas as outras pessoas do departamento que direta ou indiretamente colaboraram com a minha formação e execução de trabalho.

Agradeço também a todas as minhas outras amizades não citadas. O suporte de vocês foi primordial durante este tempo. Eu sou um felizado por ter tantas pessoas maravilhosas que me cercam e dão suporte.

Aos meus pais, Rosilene e Hudson, e ao restante da família pela compreensão, suporte e amor contínuo. Sei que não foi fácil para vocês também, por isso, essa conquista também é de vocês.

RESUMO

Características sensoriais que identificam um indivíduo são armazenadas na memória social (MS), cujo processamento depende da região CA2 do hipocampo. Diferentemente de outras regiões do hipocampo, a região CA2 se mantém tonicamente inibida por mecanismos que envolvem a ativação de receptores canabinoides. Considerando as características peculiares da região CA2 e que as demandas para machos e fêmeas em contextos sociais são diferentes, investigamos o efeito do antagonista de receptores CB1 na MS de camundongos C57/Bl6 machos e fêmeas. Os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento social, que compreende em dois encontros sucessivos (treino, TR; teste, TT), separados por 24h, com um animal juvenil do mesmo sexo. Fêmeas e machos reconheceram o juvenil como familiar, pois interagiram com o juvenil por menos tempo na sessão de teste. Porém, a administração pré-TT e intra-CA2 de AM251, antagonista de CB1, prejudicou a evocação da MS em ambos os sexos. A seguir, nos perguntamos se a condição de isolamento social (IS), conhecida por prejudicar a MS, seria capaz de alterar o tônus inibitório de CA2. Machos e fêmeas foram mantidos em grupos de 5 animais por caixa (AG) ou isolados por 7 dias (IS). Após confirmarmos que o IS prejudica a MS em animais C57/BL6, realizamos imunofluorescência para estimar o tônus inibitório por meio da marcação de neurônios GABAérgicos. Delimitamos CA2 pela marcação de purkinje cell protein 4 (PCP4), e identificamos um menor número de neurônios positivos para glutamate decarboxylase 67 (GAD67), apenas em machos isolados. Este resultado sugere que o IS pode estar reduzindo o tônus inibitório na região CA2. Em conjunto, nossos resultados suportam a conclusão de que a desinibição da região CA2 do hipocampo compromete o processamento de informações relativas à coespecíficos, possivelmente por mecanismos que diferem entre machos e fêmeas.

PALAVRAS-CHAVE: Isolamento social; CA2; Dimorfismo sexual; Memória social; Inibição

ABSTRACT

Sensory characteristics that identify an individual are stored in social memory (SM), whose processing depends on the CA2 region of the hippocampus. Unlike other regions of the hippocampus, the CA2 region remains tonically inhibited by mechanisms involving the activation of cannabinoid receptors. Considering the unique characteristics of the CA2 region and the different social demands for males and females, we investigated the effect of the CB1 receptor antagonist on the SM of C57/BL6 male and female mice. The animals underwent the social recognition test, consisting of two successive encounters (training, TR; test, TT), separated by 24 hours, with a juvenile of the same sex. Females and males recognized the juvenile as familiar because they interacted with the juvenile for less time in the test session. However, pre-TT and intra-CA2 administration of AM251, a CB1 antagonist, impaired the recall of SM in both sexes. Next, we wondered if the condition of social isolation (SI), known to impair SM, could alter the inhibitory tone of CA2. Males and females were kept in groups of 5 animals per cage (GC) or isolated for 7 days (SI). After confirming that SI impairs SM in C57/BL6 animals, we performed immunofluorescence to estimate inhibitory tone by labeling GABAergic neurons. We delimited CA2 by marking purkinje cell protein 4 (PCP4) and identified a lower number of positive neurons for glutamate decarboxylase 67 (GAD67), only in isolated males. This result suggests that SI may be reducing the inhibitory tone in the CA2 region. Together, our results support the conclusion that disinhibition of the CA2 region of the hippocampus compromises the processing of information related to conspecifics, possibly through mechanisms that differ between males and females.

KEYWORDS: Social isolation; CA2; Sexual dimorphism; Social memory; Inhibition

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMY: Amígdala

ANOVA: Análise de variância

AVP: Vasopressina

BO: Bulbo olfatório

CA: Corno Ammon

CamKII: Quinase II dependente de calmodulina

CB1: receptor endocanabinóides do tipo 1

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CE: Córtex entorrinal

DDBs: Banda diagonal de Broca

dHIP: Hipocampo dorsal

vHIP: Hipocampo ventral

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GAD: Glutamato descarboxilase

GD: Giro denteado

IS: Isolamento social

LTP: Potenciação a longo prazo

LTD: Depotenciação de longa duração

iLTP: Depotenciação de longa duração inibitória

MCD: Memória de curta-duração

MLD: Memória de longa-duração

MOE: Epitélio olfativo principal

MS: Memória social

NAc: núcleo accumbens

NMDA: N-metil-D-aspartato

NOS: Núcleo supraóptico

OCT: Ocitocina

PBS: Solução tampão de fosfato

PCP4: Proteína 4 das células de Purkinge

PNN: Redes perineurais

PVN: Núcleo paraventricular

SM: Septo medial

SLM: Stratum lacunosum moleculare

SR: Stratum radiatum

SuM: Núcleo Supramamilar

SWRs: Sharp-wave ripples

TR: Treino

TT: Teste

VNO: órgão vomeronasal

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	11
1. 1 O estudo da Memória	11
1.1.1 O estudo da memória social	16
1.2 O Hipocampo e a ascensão da região de CA2	19
1.3 Isolamento social	25
3. OBJETIVO	30
3.1 Objetivos específicos	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Animais	31
4.2 Cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias	31
4.3 Verificação do posicionamento das cânulas e eletrodos	33
4.4 Testes Comportamentais	34
4.4.1 Tarefa de Preferência por Novidade Social (PNS)	34
4.4.2 Tarefa de Reconhecimento Social (RS)	35
4.5 Administração de droga	37
4.5.1 AM251	37
4.6 Imunofluorescência (IF)	38
4.7 Aquisição das imagens	39
4.8 Análise das imagens	39
4.9 Análise estatística	40
5. RESULTADOS	41
5.1 Camundongos C57Bl6 machos e fêmeas apresentam preferência por novidade social	41
5.2 Camundongos C57Bl6 machos e fêmeas agrupados são capazes de formar MS de maneira semelhante	43
5.3 Diminuição na inibição de interneurônios através do bloqueio de receptores CB1 na região de CA2 do hipocampo de camundongos machos e fêmeas agrupados impede a evocação da memória social	45
5.4 O isolamento social de 7 dias prejudica a memória social em camundongos C57/J6 machos e fêmeas de maneira semelhante	47
5.5 O isolamento social reduz a liberação de GABA nas fibras musgosas da região de CA2 do hipocampo de machos	49
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	59

1. INTRODUÇÃO

1. 1 O estudo da Memória

[...]

 As coisas tangíveis

 Tornam-se insensíveis

 À palma da mão

 [...]

 Mas as coisas findas

 Muito mais que lindas,

 Essas ficarão”

Carlos Drummond de Andrade, Obra completa (2002)

Memória é um termo polissêmico disputado por diferentes áreas do conhecimento como filosofia, ciências da computação, história, psicologia, neurobiologia entre outras (TULVING, 2005; DUDAI; ROEDIGER; TULVING, 2007; MORRIS, 2007). Essa disputa não se trata de quem detém a palavra ou qual definição é a correta, mas sim de diferentes perspectivas sobre o mesmo fenômeno. Trata-se de diferentes prismas sobre um mesmo fenômeno. Logo, se faz necessário pontuar que dentro dos diferentes conceitos abarcados pela multidisciplinaridade desta palavra, este trabalho se refere à memória sob o ponto de vista da neurobiologia.

Na neurobiologia, há diferentes maneiras de compreender a memória. Pode-se conceituar a memória como um processo dinâmico onde experiências são codificadas em representações internas armazenadas no sistema nervoso ao longo do tempo, sendo este processo fruto de mudanças na atividade e na organização celular (DUDAI, 2004; JOSSELYN; TONEGAWA, 2020). Há também um conceito de que a memória é a capacidade de codificar, reter e evocar informações (IZQUIERDO, 2011; SCHACTER, 2007; TULVING, 2005). Outra abordagem consiste em focalizar a memória no ato de lembrar, considerando a memória como um produto da interação entre sua representação física no cérebro, denominado de engrama, e pistas ambientais (MOSCOVITCH, 2007; SEMON, 1921; DUDAI, 2002). Esses e outros conceitos estão em constante evolução e em consonância com os avanços da ciência da memória (KANDEL, 2009).

Após a aceitação da comunidade de que a memória é um processo neurobiológico, a ciência da memória se debruçou em entender se a memória está ligada a uma região específica do cérebro, semelhante ao que ocorre com outras

funções cognitivas como linguagem e percepção (KANDEL, 2009). A resposta a este questionamento veio com a ideia moderna de que a memória não é uma entidade única ligada exclusivamente a uma área. Porém, existem múltiplos tipos de memórias associadas de maneira singular a áreas específicas no encéfalo (SQUIRE 1987; WEISKRANTZ 1987;89 DUDAI 1989; BADDELEY 1990; SCHACTER AND TULVING 1994; EICHENBAUM AND COHEN 2001; BUCKNER, 2007).

Por não se tratar de um processo único, a memória pode então ser sistematizada em duas dimensões gerais: a primeira de acordo com seu tempo de duração e a segunda de acordo com a sua natureza. Em relação ao tempo de duração, as representações mnemônicas que perduram durante um intervalo curto de tempo, de segundos a poucas horas, são denominadas de memória de curta duração. Neste processo, a formação da memória é dependente da facilitação sináptica de áreas que participam da codificação sensorial (EMPTAGE; CAREW, 1993). Por outro lado, existem representações duráveis, que perduram de horas até anos, denominadas de memória de longo prazo (ASOK et al., 2019). Tal fenômeno é dependente de síntese proteica e fortalecimento sináptico de regiões específicas do cérebro (BIRD, 2017; DUDAI; KARNI; BORN, 2015).

Apesar de estar sendo recentemente revista (FERBINTEANU, 2019), a classificação de acordo com a natureza divide a memória em dois sistemas principais, memórias declarativas e não-declarativas (IZQUIERDO, 2011, 2015; SCHACTER; TULVING, 1994; SQUIRE, 2004, 2007). Memórias declarativas são externalizações conscientes de conceitos, fatos e eventos (SQUIRE 2004, 2007; DHARANI, 2015). Geralmente são estes tipos de processos mnemônicos que nos referimos no cotidiano quando utilizamos a palavra memória. Em contrapartida, as memórias não declarativas se referem à capacidade de reter habilidades motoras, hábitos e condicionamentos, sendo evocadas com pouco ou nenhum processamento consciente (DHARANI, 2015; PACKARD; WHITE; HA, 1978; PAUL; SQUIRE, 2002).

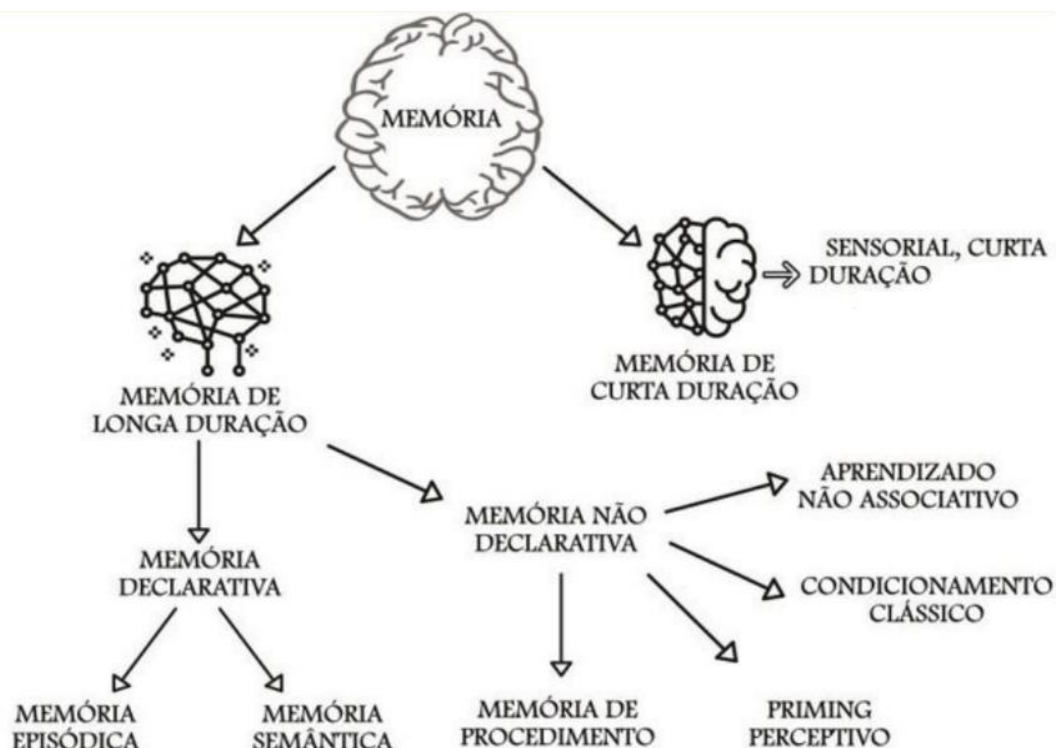


Figura 1: Taxonomia dos sistemas de memória de longa duração em mamíferos. A memória de longa-duração em mamíferos é dividida em dois grandes grupos: declarativas e não-declarativas. A memória declarativa é subdividida em memória para fatos (semântica) e para eventos (episódica), ambas têm como estrutura central para o seu processamento o lobo temporal medial. Compreendem o grupo das demais memórias (não-declarativas), os sistemas de memória para habilidades e hábitos, —priming e aprendizado perceptual, condicionamento clássico e aprendizado não associativo (Alterado de Fogaça, 2019).

Apesar da interação entre o ambiente e os sistemas de memórias serem processos altamente dinâmicos, para seu estudo estes podem ser divididos didaticamente em três fases sucessivas: aquisição, consolidação e evocação. Entretanto, esta divisão não reflete precisamente a forma como essas fases acontecem, já que podem se sobrepor (DE OLIVEIRA ALVARES; DO-MONTE, 2021).

O processo de aquisição consiste na codificação de informações do ambiente pelos sistemas sensoriais e posterior envio da informação às áreas associativas. O padrão de informações estabelecido pela aquisição é transformado em um traço de memória transitório, representado pelo conjunto de neurônios recrutados para formação de tal padrão (DUDAI, 2004; KORTE; SCHMITZ, 2016).

Com a formação do engrama recém-criado e a reorganização desencadeada pelo processo de aquisição, torna-se imperativo alcançar novamente uma certa

estabilidade. Isso é essencial para que as mudanças na conectividade celular se consolidem e para evitar alterações expressivas no conteúdo da nova memória (DE OLIVEIRA ALVARES; DO-MONTE, 2021; DUDAI, 2004). Logo, a formação da memória não é instantânea, a consolidação do traço de memória pode durar de horas a anos. Sendo Na realidade é um processo praticamente contínuo, uma vez que as memórias que adquirimos estão sempre sendo atualizadas por meio de outros fenômenos, como por exemplo a reconsolidação (ROEDIGER; DUDAI; FITZPATRICK, 2007).

Após a consolidação, as informações podem reemergir por meio da evocação, que ocorre quando o sujeito é exposto a pistas ambientais externas e internas que reativam o traço de memória o deixando mais sensível a interferências (STARESINA; WIMBER, 2019; HUPBACH et al., 2007; NADER, 2015). O fato de a evocação deixar o engrama susceptível a alterações pode levar ao enfraquecimento ou fortalecimento do traço de memória, contribuindo para o esquecimento ou reconsolidação, respectivamente (DE OLIVEIRA ALVARES; DO-MONTE, 2021; ROEDIGER; DUDAI; FITZPATRICK, 2007; HUPBACH et al., 2007).

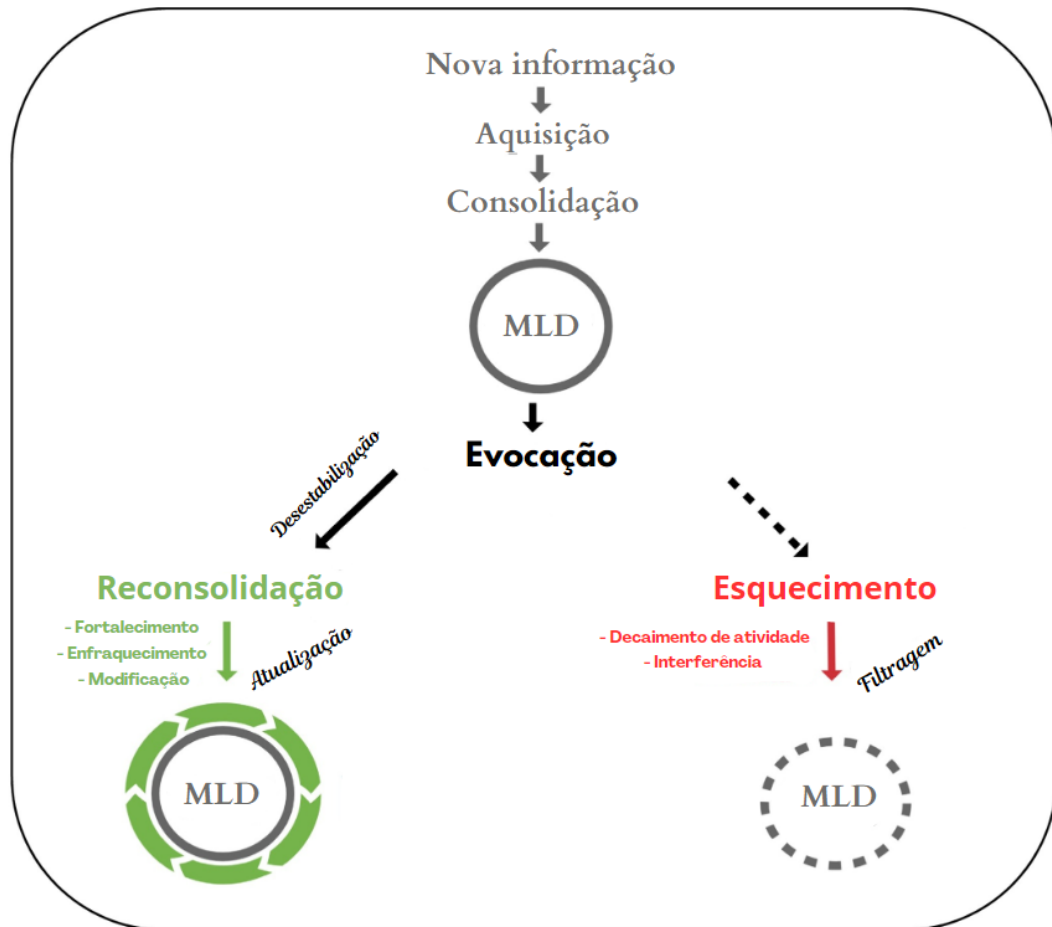


Figura 2: Esquema sobre a formação da memória. Durante a fase inicial da formação da memória, novas informações são adquiridas do ambiente e consolidadas como memória de longa duração (MLD). A subsequente evocação da memória consolidada pode levar a dois processos distintos: I) a reconsolidação, desencadeada pela reativação do traço que o deixa mais sensível a modificações, o que leva a atualização através da alteração da memória original e a incorporação de novas informações II) o esquecimento resultante de um déficit na recuperação da memória original que leva a diminuição da atividade do traço de memória. O esquecimento pode servir como um filtro para remover informações desnecessárias. (Alterado de DE OLIVEIRA ALVARES; DO-MONTE, 2021)

Após a compreensão do conceito, a organização e as fases da memória podem-se explorar os sistemas particulares associados aos diferentes tipos de memória, como a memória social. Também é relevante considerar fatores que interagem com esses sistemas, como a variação na expressão da memória entre os sexos.

1.1.1 O estudo da memória social

“Os mais aptos são, portanto, os animais mais sociáveis, e a sociabilidade aparece como o principal fator de evolução, tanto diretamente, ao assegurar o bem-estar da espécie e diminuir a perda de energia, quanto indiretamente, ao favorecer o desenvolvimento da inteligência.”

Piotr Kropotkin, Ajuda mútua: Um fator de evolução (1902)

Memória Social (MS) é o processo cognitivo de adquirir, consolidar, e eventualmente, recuperar informações sobre indivíduos coespecíficos (LUNARDI et al., 2021). Animais sociais utilizam da MS como substrato para exibir e organizar comportamentos apropriados durante interações sociais, como agressão, fuga, cooperação e corte (OKUYAMA, 2018). Esses comportamentos podem ser observados em microrganismos unicelulares, invertebrados e em mamíferos, como camundongos e seres humanos (CHEN; HONG, 2018). Podemos considerar então que a busca para estabelecer e manter conexões sociais pode ser uma “necessidade inata” evolutivamente conservada em espécies gregárias (MATTHEWS; TYE, 2019).

Interações sociais envolvem detecção e resposta a uma multiplicidade de modalidades sensoriais que são integradas de forma dinâmica entre os participantes. Assim sendo, pode haver divergências entre espécies em relação aos substratos neurais que sustentam a MS. Posto isso, os processos descritos a seguir dizem respeito ao funcionamento da cognição social de camundongos, um dos principais modelos de estudos para memória social.

Em camundongos, as características olfativas específicas de cada animal desempenham um papel fundamental como dados primários na construção da memória social. Logo, para que estes animais reconheçam seus co-específicos se faz necessária a habilidade de perceber e discernir odores sociais, além do processamento destas informações sensoriais (WYATT, 2010; 2017). Este processo se dá por meio de combinações únicas da ativação de quimiorreceptores, distribuídos ao longo do epitélio olfativo principal (MOE) e órgão vomeronasal (VNO). Os neurônios olfativos enviam projeções para o bulbo olfatório principal (BO), que processa e distribui a informações para o hipocampo via córtex entorrinal (CE), principalmente para a porção ventral de CA1 (CA1v) e dorsal de CA2 (dCA2) (KELLIHER, 2007; SANCHEZ-ANDRADE; KENDRICK, 2009; MEIRA et al., 2018; OKUYAMA e al., 2018). Assim, as informações sobre odores conseguem alcançar as áreas corticais superiores envolvidas na consciência, assim como áreas relacionadas a respostas

motivacionais e emocionais, como a amígdala (AMY) e núcleo accumbens (NAc) (KOGAN et al., 2000; SANCHEZ-ANDRADE; KENDRICK, 2009).

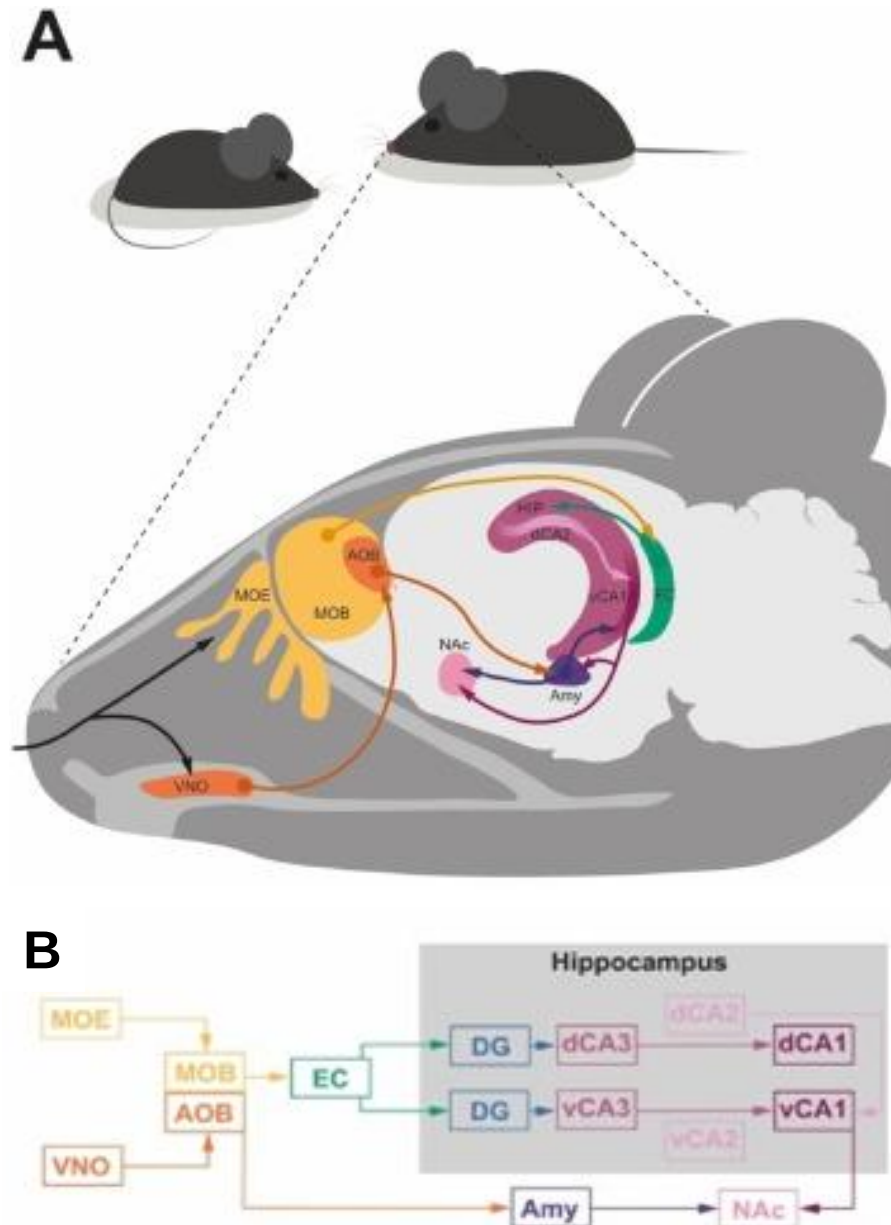


Figura 3: Esquema da memória social (A) Ilustração dos circuitos neurais da memória social no cérebro de camundongos. (B) Diagrama da memória social nos circuitos. Amy: Amígdala; AOB: bulbo olfativo acessório; dCA1: CA1 dorsal; dCA2: CA2 dorsal; dCA3: CA3 dorsal; DG: giro dentado; EC: córtex entorrinal; HIP: Hipocampo; MOB: bulbo olfativo principal; MOE: epitélio olfativo principal; NAc: núcleo accumbens; vCA1: CA1 ventral; vCA2: CA2 ventral; vCA3: CA3 ventral; VNO: órgão vomeronasal. (ADAPTADO DE LUNARDI et al., 2021)

A pesquisa sobre a neuroquímica da memória social concentra-se principalmente no papel dos neuropeptídeos ocitocina (OCT) e vasopressina (AVP),

produzidos no núcleo paraventricular (PVN) e núcleo supraóptico (NSO) do hipotálamo (CASTEL; MORRIS, 1988). Estudos apontam para a OCT como um elemento mais importante durante a fase de aquisição da memória (FERGUSON et al., 2000), enquanto a AVP desempenha um papel crucial na consolidação da MS (FERGUSON et al., 2002). Além desses neuropeptídeos, outros neurotransmissores têm forte ligação com a cognição social. Pesquisas realizadas com camundongos *knockout* para CB1 no hipocampo, receptores endocanabinóides que apresentam alta afinidade para a anandamida, demonstraram que estes animais apresentam prejuízos na MS (PALMISIANO et al., 2023).

O gênero também exerce influência na memória social, Markham e Juraska (2007) demonstraram que o tempo total de investigação de um coespecífico juvenil durante a tarefa de reconhecimento social em ratos Long-Evans é maior em machos, quando comparados com fêmeas. Ademais, este efeito sexo dependente não está associado com o ciclo estral em fêmeas. Ainda assim, hormônios sexuais como o estrógeno podem apresentar efeito modulador na cognição social, fêmeas *knockout* para receptores de estrógeno apresentam déficit na MS (CHOLERIS et al., 2003). De forma complementar, a suplementação de estrógeno em fêmeas ovariectomizadas beneficia a MS (TANG et al., 2005).

O estudo dos comportamentos sociais em laboratório não consegue abarcar toda a variedade e complexidade ecológica vista na natureza, logo, na pesquisa são utilizados ensaios comportamentais e ensaios laboratoriais específicos para inferir sobre os mecanismos fisiológicos e os circuitos neurais que compõem separadamente a cognição social. A avaliação da MS em animais de laboratório pode seguir diferentes protocolos, mas geralmente o tempo de investigação olfativa é utilizado como indicador comportamental. Durante os protocolos pode-se inferir se um animal experimental reconhece determinado estímulo como familiar ou novo com base no tempo de investigação (DUDAI, 2002; NORMAN; O'REILLY, 2003; SQUIRE; WIXTED; CLARK, 2008). Um dos protocolos mais utilizados para testar a MS foi idealizado por Thor e Holloway (1934), onde um animal novo é apresentado ao experimental em um primeiro momento denominado treino, após um tempo este animal é reapresentado ao animal experimental, durante a sessão de teste. O tempo que o animal passa interagindo durante as sessões serve como indicativo para a formação ou não da MS, o teste é baseado na premissa de que camundongos têm a tendência natural de

interagir mais com novidades sociais comparada com familiares. Ao se apresentar simultaneamente dois animais estímulos, denominamos o protocolo como discriminação social, onde se é esperado que o animal reconheça e diferencie entre os dois (BIRD, 2017). Além disso, tarefas de memória social também podem ser utilizadas para inferir sociabilidade, esperando que o animal explore um coespecífico novo e/ou prefira um estímulo social a um não-social (FERGUSON; YOUNG; INSEL, 2002; KOOIJ; SANDI, 2012; MARKHAM; JURASKA, 2007; PERNA; ENGELMANN, 2015).

Embora a memória social sendo um processo altamente dinâmico que transita do nível molecular até a expressão de fato do comportamento envolvendo diferentes regiões cerebrais, estudos recentes vêm comprovando o papel crítico que a região de CA2 do hipocampo tem para os processos mnemônicos subjacentes à cognição social. No entanto, ainda há lacunas a serem preenchidas sobre a compreensão do funcionamento dessa região.

1.2 O Hipocampo e a ascensão da região de CA2

“A memória guardará o que valer a pena. A memória sabe de mim mais que eu; e ela não perde o que merece ser salvo.”

Eduardo Galeano, *Dias e noites de amor e de guerra* (2001)

A formação hipocampal é um sistema funcional crucial para as memórias de longo-prazo (MLP), o aprendizado, a navegação espacial e as emoções. Sua estrutura é composta por 4 regiões: giro denteado; hipocampo (HIP) (CA1, CA2 e CA3); complexo subicular (subículo, pré-subículo e para-subículo) e córtex entorrinal (AMARAL, WITTER, 1989; AMARAL; LAVENEX, 2007). Este sistema está conectado a áreas corticais e subcorticais, integrando informações de diferentes naturezas vindas de regiões distintas do encéfalo. Dessa forma, as diferentes sub-regiões estão engajadas de maneira diferente no processamento de informações no hipocampo. Além disso, a formação hipocampal é uma das únicas regiões do cérebro que continua a formar novos neurônios durante a fase adulta (ALTMAN, 1962; ALTMAN, 1965). Não só isso, mas a formação hipocampal também apresenta diferenças sexuais em diversos mamíferos. No entanto, as especificidades e magnitude destas diferenças ainda não são muito claras, pois podem depender de fatores como idade, metodologia

e ambiente (KOSS; FRICK, 2017). São necessários mais estudos, principalmente se tratando das funções do HIP de fêmeas.

O hipocampo apresenta uma divisão ao longo do seu eixo rostro-caudal em região: dorsal; intermediária, com características combinadas das porções vizinhas; e ventral. Essa segmentação é baseada nas diversas conexões de entrada e saída dessas regiões, além da distinção funcional entre elas. Enquanto o hipocampo dorsal (HD) está mais vinculado ao processamento cognitivo, o hipocampo ventral (HV) desempenha um papel na resposta ao estresse e no processamento emocional (FANSELOW; DONG, 2010; KNIERIM, 2015; MORRIS, 2006; MOSER; MOSER, 1998). Está divisão funcional dicotômica vem sendo contestada, tendo em vista achados eletrofisiológicos e anatômicos recentes, que apontam para uma aparente divisão em gradientes funcionais ao longo dos eixos. Esta visão também é sustentada pela expressão gênica organizada em domínios funcionais ao longo das áreas (STRANGE et al., 2014).

O fenômeno da potenciação de longo prazo (LTP), uma das formas de plasticidade sináptica presentes no encéfalo, desempenha um papel crucial nas funções de aprendizado e na formação de MLP pelo hipocampo. Os mecanismos envolvidos na indução e manutenção da LTP variam de acordo com a região ou sinapse em que o fenômeno é induzido no hipocampo. Interessantemente, a porção de CA2 apresenta características morfofisiológicas próprias que a destaca das demais. Dentre essas características próprias, CA2 apresenta neurônios com dimorfismo sexual (BARTESAGHI, RAVASSI., 1999), padrão de potenciação de longa duração distinto e mais resistente quando comparado com as outras zonas do HIP (ZHAO et al., 2007; KOHARA et al., 2014), além de padrões de voltagem e corrente nas sinapses das fibras musgosas menores do que em CA3 (Sun et al., 2017).

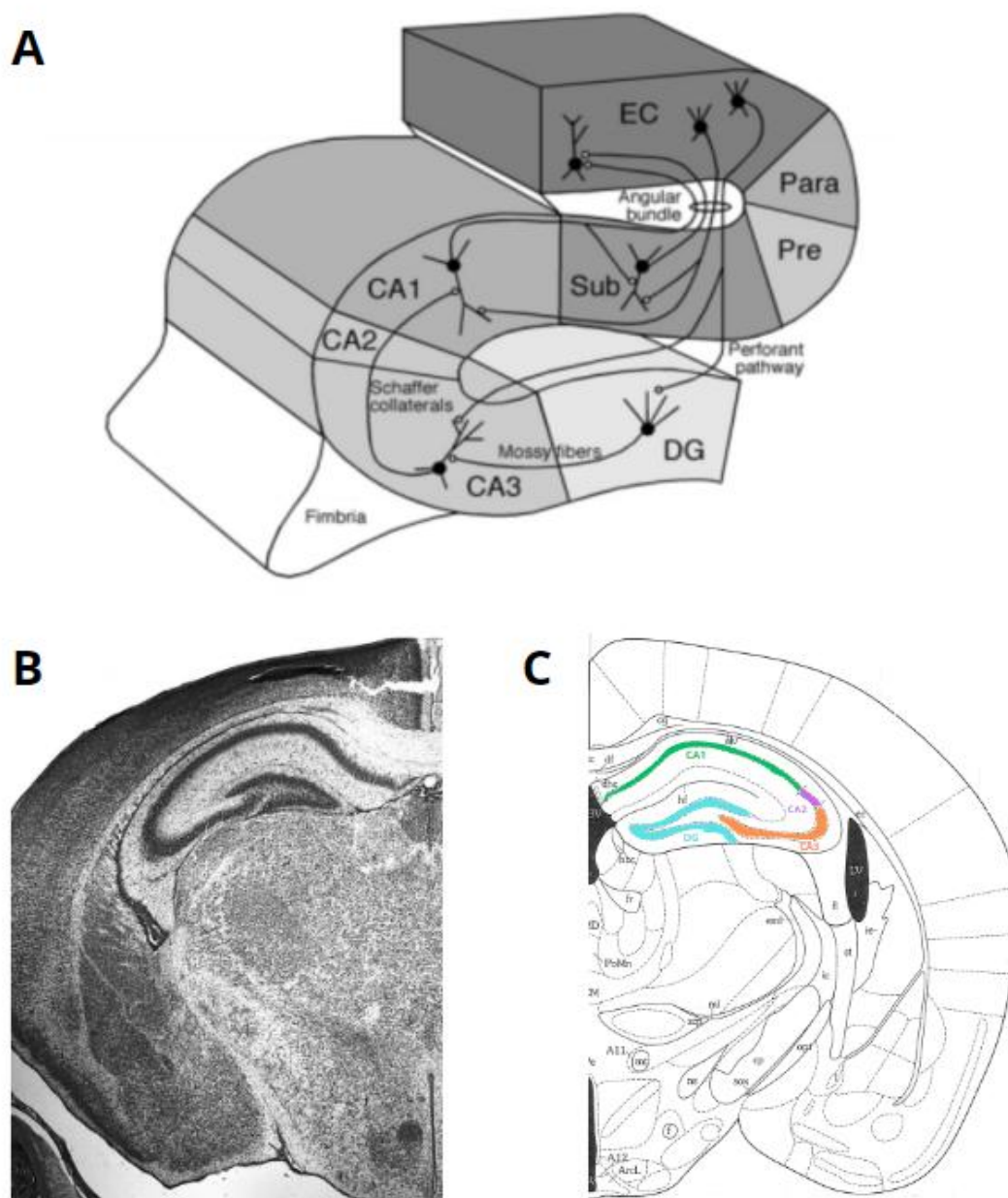


Figura 4 – Hipocampo (A) O circuito tri sináptico clássico da formação hipocampal. EC: córtex entorrinal; Para: para-subículo; Pre: pré-subículo; Sub: subículo. (B) Fatia transversal do cérebro de um camundongo marcada com Nissil (C) Esquema da organização geral das subdivisões do hipocampo. Imagens modificadas de AMARAL; LAVENEX, 2006; PAXINOS, 2007)

A área de CA2 é uma pequena região localizada no HIP que foi descrita há mais de 75 anos por Lorente de Ló (1934). Entretanto, esta estrutura foi considerada por muito tempo como uma região de transição de CA1 para CA3 sem funções ou características próprias. Contudo, trabalhos vêm demonstrando que CA2 não só desempenha papéis importantes nas funções hipocampais de memória e aprendizado

(HITTI, SIEGELBAUM, 2014; MEIRA et al., 2018; LEHR et al., 2021) como apresenta uma citoarquitetura própria que a diferencia das demais regiões do HIP (THOMPSON et al., 2008). Parte das descobertas acerca desta região só foram possíveis graças às novas técnicas de manipulação gênica e da descrição de marcadores moleculares específicos. Em estudos recentes, após analisar marcadores de CA2 ao longo dos eixos dorsoventral e proximodistal, Radzicki et al (2022) sugeriu que a região, na realidade, é maior do que o descrito inicialmente. Curiosamente, a área de CA2 compreende uma fração maior do hipocampo em primatas humanos e não-humanos, quando comparado com outros animais sociais, como camundongos (LORENTE DE NÓ, 1934).

Corroborando com a visão mais recente das divisões do HIP, CA2 também apresenta gradientes de expressão gênica diferentes ao longo dos eixos que podem estar relacionados com funções diferentes, desempenhados pela mesma estrutura (CEMBROWSKI, et al 2016; STRANGE et al., 2014). Em concordância, registros eletrofisiológicos revelaram que existem gradientes de forças excitatórias saindo do córtex entorrinal que projetam para células piramidais da porção distal de CA2 com mais força, enquanto para a fração proximal é menos proeminente (FERNANDEZ-LAMO et al., et al 2019). Existem diferenças funcionais também no eixo radial, onde células superficiais e profundas apresentam padrões de disparos heterogêneos, particularmente durante as sharp-wave ripples (SWRs) (OLIVA et al., 2016) e plasticidade sináptica inibitória (LOISY; BOUISSET, et al., 2022).

Devido a sua localização centralizada na formação hipocampal CA2 envia projeções excitatórias para todas as regiões do hipocampo, inclusive para si mesma, e recebe aferências das outras sub-regiões do HIP, exceto CA1. (LEHR et al., 2021; OKAMOTO; IKEGAYA, 2019). Ademais, a circuitaria de CA2 também estabelece conexões com outras áreas extrahipocampais como o núcleo supramamilar, amígdala, núcleo paraventricular, banda diagonal da área de Broca e rafe medial (CUI et al., 2013). Os neurônios piramidais também apresentam morfologia distinta. O corpo celular é maior que o das células de CA1. Já os dendritos com excrescência espinhosa e especializações pós-sinápticas associadas às fibras musgosas são similares às apresentadas em CA3 (DUDEK et al., 2016).

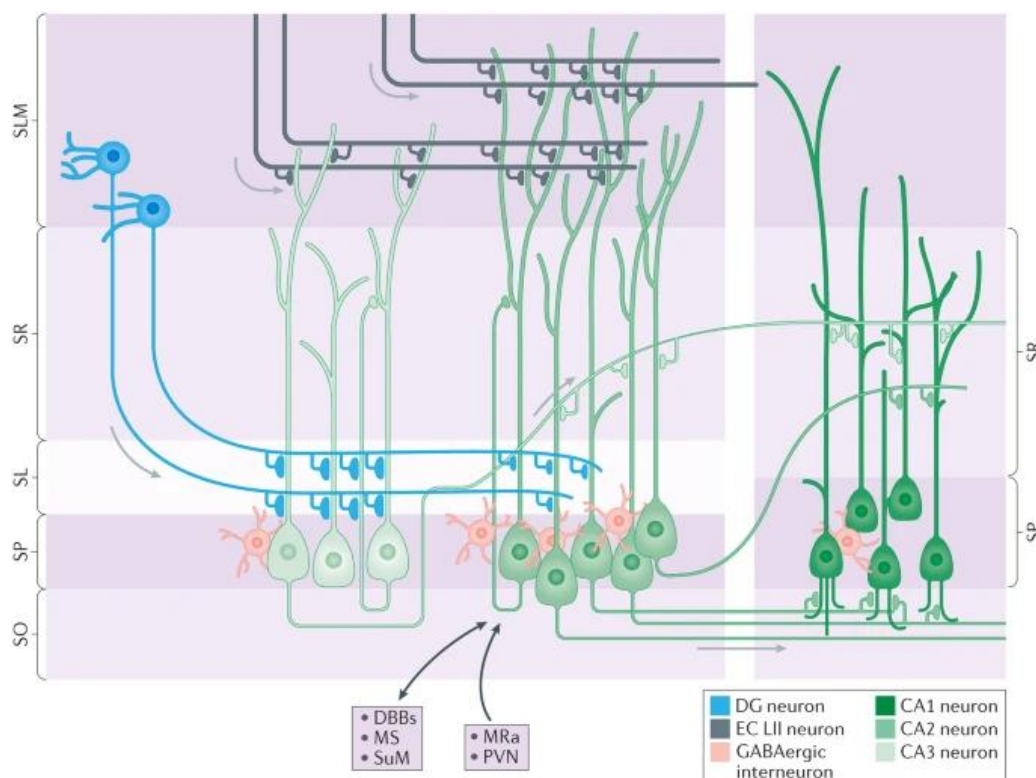


Figura 5 – Conectividade entre CA2 e regiões intra e extra hipocâmpais. A região CA2, situada entre as regiões CA3 e CA1, é essencial na circuitaria hipocâmpal. As vias aferentes principais chegam via DG, neurônios CA3 e neurônios do córtex entorrinal medial e lateral. A CE projeta profundamente na região SR. Neurônios piramidais da CA2 projetam-se principalmente para neurônios CA1, com dendritos no *estrato oriens* (SO). As entradas extrahipocâmpais incluem neurônios vasopressinérgicos no PVN e núcleo mediano da rafe, além de conexões recíprocas com núcleo supramamilar (SUM), septo medial (SM) e banda diagonal de Broca (DBBs). A área CA2 abriga vários tipos de interneurônios inibitórios, destacando-se pela densidade de interneurônios imunopositivos para reelin e parvalbumina em comparação com CA1 e CA3. (ADAPTADO DE DUDEK; ALEXANDER; FARRIS., 2016)

Em conformidade com as especificidades das conexões, a região de CA2 também apresenta características específicas na expressão de receptores para neuropeptídeos, sobretudo aqueles considerados “sociais” como a vasopressina e a ocitocina (YOUNG et al., 2006; LEE et al., 2008). Essa porção do hipocampo recebe a maioria das entradas oriundas do PVN, um dos principais núcleos produtores destes peptídeos (CUI et al., 2013). Estudos com camundongos *knockout* para o receptor de vasopressina *Avpr1b*, expressos principalmente em neurônios piramidais em CA2 (YOUNG et al., 2006), mostraram que estes animais apresentavam déficits no reconhecimento social e em comportamentos agressivos (DEVITO et al., 2009; CYMERBLIT-SABBA ET AL., 2023). Em concordância com os dados anteriores,

animais *knockout* para receptores de ocitocina em CA2 também apresentam prejuízos na MS (CYMERBLIT-SABBA ET AL., 2023).

Todas estas conexões e particularidades regionais possibilitam CA2 desempenhar um papel central na neuromodulação e organização dos processos mnemônicos, cognitivos e comportamentais (BENOY et al., 2018). Em se tratando especificamente de processos mnemônicos, CA2 apresenta uma grande relevância funcional no processamento da MS e de memórias espaciais (HITTI, SIEGELBAUM, 2014), sendo a região dorsal de CA2 crucial para a formação da MS, em conjunto com a região ventral de CA1 (MEIRA et al., 2018). Quando observado em nível celular, durante a formação da MS CA2d mais está relacionado com a formação da memória de coespecíficos novos (MEIRA et al., 2018), enquanto células de CA1v respondem mais a coespecíficos familiares (RAJNISH et al., 2019).

Uma das peculiaridades mais intrigantes de CA2 é a resistência à plasticidade sináptica, pelo menos nos moldes em que ela é conhecida atualmente. sua Existem evidências que apontam para expressão diferencial, matrizes extracelulares, proteínas específicas e janelas de desenvolvimento como agentes causadores deste fenômeno (CARSTENS; DUDEK., 2018). Curiosamente, esta resistência em gerar LTP é restrita às sinapses que ocorrem no *stratum radiatum* (SR), sendo que as potenciações induzidas pelo CE no *stratum lacunosum moleculare* (SLM) acontecem normalmente (CHEVALEYRE; SIEGELBAUM., 2010). De forma geral, os mecanismos envolvidos na supressão da plasticidade em CA2 envolvem regulação intracelular dos níveis de cálcio, já que a indução de atividade sináptica ocorre por meio de cascatas de sinalização e atividade celular dependentes do Ca^{2+} (HERRING; NICOLL et al., 2016). Quando comparado com a região de CA1, os dendritos da região de CA2 apresentam extrusão menor de cálcio e padrão de resposta mais devagar ao cálcio livre (SIMONS et al., 2009), estes achados corroboram com a ideia de respostas regionais diferenciais nos mecanismos de indução de LTP.

Existem também proteínas altamente expressas em CA2 que também atuam na limitação de sua plasticidade sináptica. A proteína 4 da célula de Purkinje (PCP4), marcador molecular de fibras musgosas descritos para CA2, é uma das responsáveis pela resistência da área em sofrer LTP (SAN ANTONIO et al., 2014; DUDEK et al., 2014). Isso se deve ao fato de a PCP4 ser responsável pela associação/desassociação do cálcio com as calmodulinas. A reguladora de

sinalização de proteína 14 (RGS14), utilizada para marcar neurônios piramidais em CA2 (EVANS et al., 2018), também é um agente dificultador da promoção de LTP, já que ela interage com cálcio e com a quinase II dependente de calmodulina (CaMKII), proteína fundamental para os processos de plasticidade sináptica (LEE et al., 2010). Além disso está porção do HIP também é rica em redes perineuronais (PNN's), que são estruturas especializadas que recobrem neurônios e dendritos, que são apontadas como um dos principais freios para a plasticidade sináptica (CARSTENS et al., 2016).

Para além da LTP, a depotenciação de longa duração (LTD) também vem sendo alvo de estudos para uma compreensão mais profunda da área, principalmente no que tange a MS. Estudos recentes vêm demonstrando que a LTD em interneurônios é crucial para promoção da plasticidade sináptica inibitória durante o processo da aquisição da memória social em camundongos (PISKOROWSKI; CHEVALEYRE, 2013; LEROY ET AL., 2017). O mecanismo de LTD na área pode ser induzido de maneira heterogênea, onde um agrupamento de neurônios responde a estímulos de baixa intensidade enquanto outros não (ZHAO et al. 2007). Bem como, a ativação de diferentes receptores também leva a depotenciação não-uniforme da região, por exemplo, a LTD em interneurônios parvalbumina positivos em CA2 através de receptores delta opioides (DOR) é determinante na formação da MS (PISKOROWSKI AND CHEVALEYRE, 2013A; PISKOROWSKI ET AL., 2016). Igualmente, a LTD em sinapses inibitórias de CA2 mediada por receptores endocanabinóides tipo 1 (CBR1) também é crucial no processo de formação da MS e ocorre em interneurônios CCK+ (LOYSE et al., 2022). A ocorrência de LTD inibitória (iLTD) nos interneurônios em CA2 é um mecanismo primordial para formação da memória, já que leva a desinibição dos neurônios piramidais da área e possibilita a ocorrência de LTP que antes era restringida (LOYSE et al., 2022).

1.3 Isolamento social

“A natureza parece muito particularmente interessada em implantar em nós a necessidade das relações de amizade e Aristóteles afirma que os bons legisladores se preocupam mais com essas relações do que com a justiça. É verdade que amizade assinala o mais alto ponto de perfeição na sociedade. Em geral sentimentos a que damos o nome de amizade, nascidos da satisfação de nossos prazeres, das vantagens que usufruímos, ou de associações formadas em vista de interesses públicos ou privados, são menos belos, menos generosos, e participam tanto menos da amizade, a qual tem outras causas, visa a outros fins.”

Espécies que formam estruturas organizadas socialmente dependem de conexões sociais para a manutenção da sua saúde e sobrevivência (EISENBERGER, 2012). Viver em sociedade é uma estratégia evolutivamente bem conservada ao longo do tempo, já que a vida em grupo ajuda na procura de recursos, proteção mútua, divisão de trabalho, oferece suporte emocional e facilita o encontro de pares para reprodução. Porém, a vida em sociedade também oferece riscos e custos como a competição e aumento da taxa de transmissão de patógenos (ALEXANDER, 1974).

Mecanismos neurais, hormonais e genéticos que auxiliam na manutenção destas sociedades evoluíram de maneira conjunta com a estratégia de formar grupos. Logo, para manter e garantir a socialização, existe um sistema homeostático social que detecta perturbações nas relações sociais e coordena mecanismos efetores para restabelecer o contato social (LEE; CHEN & TYE, 2021). Assim, o isolamento social (IS) pode ser considerado uma ameaça à sobrevivência destas espécies, além de uma condição perturbadora da homeostase social.

Em humanos, o conceito de isolamento social pode ser expandido para a percepção subjetiva da condição do isolamento, comumente denominada de solidão, não se atendo somente a condições exclusivamente físicas de espaço. A existência de contatos sociais frequentes não prediz, por si só, a percepção da qualidade das conexões sociais (HAWKLEY et al, 2008; WHEELER; REIS; NAZLEK, 1983). Condições como exclusão social, baixa quantidade ou qualidade nas interações sociais e discriminação social podem ser consideradas condições análogas a solidão, podendo ser interpretadas como estressores pelo indivíduo que podem buscar maneiras de evitar sofrer com as consequências destes estados (MATTHEWS; TYE, 2019).

Estudos epidemiológicos vêm apontando para uma relação causal entre o isolamento social e a saúde das pessoas (HOLT-LUNSTAD et al., 2010; PERISSINOTTO; COVINSKY, 2014). Em relação às funções cognitivas o IS pode acentuar a percepção de estímulos sociais negativos (SHINTEL, CACIOPPO; NUSBAUM, 2006), contribuir no desenvolvimento de transtornos afetivos (IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016), distúrbios de personalidade, transtorno de ansiedade, depressão e aumento no risco da doença de Alzheimer, demência (CACIOPPO et al., 2006; DENIRO, 1995; MATTHEWS et al., 2016; WILSON et al., 2007; HOLMEN,

ERICSSON, WINBLAD, 2000). Para além do psicológico, o IS também contribui no declínio da saúde física, ao alterar mediadores comportamentais e mecanismos biológicos, como a qualidade do sono e pressão sanguínea (CACIOPPO, 2020). Ao serem modificados pelo isolamento, estes mediadores podem levar ao aumento da morbidade e mortalidade de doenças cardiovasculares (HAWKLEY; CACIOPPO, 2003), desregulação da resposta inflamatória e neuroendócrina (EISENBERG et al., 2017; HACKETT et al., 2012) e desenvolvimento de síndromes metabólicas (HAWKLEY, 2006).

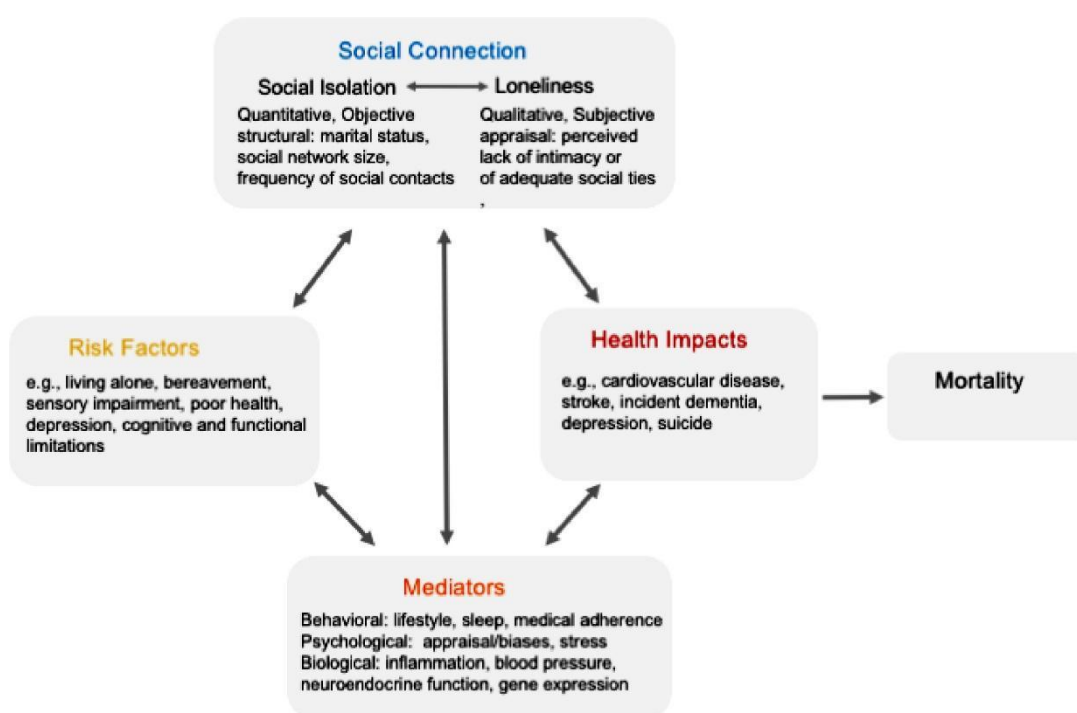


Figura 6 – Esquema que resume os efeitos do isolamento social na saúde e mortalidade e a relação dos fatores de risco e mediadores comportamentais, psicológicos e biológicos. (Adaptado de DONOVAN; BLAZER., 2020)

Nem sempre os fatores causais por detrás das alterações biológicas causadas pelo IS são possíveis de serem estudados de maneira conclusiva em humanos, por isso, para compreender os mecanismos e alterações estruturais são utilizados como objetos de estudo espécies de animais gregários. Com isso, pode-se fazer alterações em alvos biológicos específicos e manipulações que ajudam a elucidar melhor os efeitos do IS.

Nosso grupo tem se dedicado a entender como o IS de 7 dias afeta a cognição e memória social dos animais. Nossos resultados também suportados por outros

achados demonstraram que o IS causa diminuição de áreas cerebrais (BURROWS et al., 2011; GUARNIERI et al., 2020) distúrbios na neurotransmissão do glutamato (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019), dopamina no bulbo olfatório (GUARNIERI et al., 2020). Além disso, a falta de contato social pode reduzir a neurogênese em animais adultos (GUARNIERI et al., 2020; SCHOENFELD; GOULD, 2012), levar a alterações comportamentais, alteração de síntese proteica (WALLACE, 2009) e prejuízos mnemônicos (GUARNIERI et al., 2020; GUSMÃO et al., 2012a; MONTEIRO et al., 2014). Curiosamente, a promoção da neurogênese através do enriquecimento social (MONTEIRO et al., 2014) e a ressocialização (RIVERA et al, 2020) são condições capazes de reverter os prejuízos causados pelo isolamento na MS de longa duração.

2. JUSTIFICATIVA

Manter conexões sociais de qualidade é um agente fundamental na dinâmica e sobrevivência dos seres sociais ao longo de todo reino animal. Sabe-se que os comportamentos sociais são constructos complexos que têm como base a memória social. A região de CA2 do hipocampo sexualmente dimórfica é uma área sensível a mudanças ambientais, além de desempenhar um papel central na cognição social e processamento de MS (LOYSE et al., 2023, MEIRA et al., 2018). Estudos vêm demonstrando um papel primordial da sinalização endocanabinóide no processamento e formação da memória social (KOMOROWSKA-MÜLLER et al., 2021). Como a região de CA2 também está intimamente implicada na formação da memória social, decidimos investigar o papel dos receptores CB1 na fase de evocação da memória social de camundongos machos e fêmeas. Ao se considerar relações sociais como uma necessidade inata, o isolamento social se apresenta como um fator de risco no desenvolvimento de prejuízos cognitivos e diminuição da longevidade, esta condição causa alterações bioquímicas, moleculares, morfológicas e funcionais (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019; GUARNIERI et al., 2020; MUMTAZ et al., 2018). Os efeitos do isolamento social (IS) na cognição social e seus mecanismos neurais ainda não foram completamente compreendidos. Notavelmente, há uma lacuna significativa de conhecimento, especialmente quando se trata dos efeitos do IS em fêmeas. Além disso, a relação entre o IS e a região de CA2, conhecida por ser crucial para a memória social, permanece pouco explorada. Dessa forma, com este trabalho buscamos investigar o papel dos receptores CB1 em CA2 na evocação da memória social de machos e fêmeas e entender se o IS social pode induzir mudanças funcionais e morfológicas em CA2 de maneira sexo dependente.

3. OBJETIVO

Investigar o papel do tônus inibitório modulado pelos receptores CB1 da região de CA2 na memória social e se o isolamento social também está relacionado com alterações fisiológicas e morfológicas do balanço inibitório da área, além de avaliar se estes efeitos são sexualmente dimórficos.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar se os camundongos C57 machos e fêmeas expressam preferência a novidade social e memória social de maneira similar.
- Investigar se o bloqueio de receptores CB1 prejudicam a evocação da memória social de camundongos machos e fêmeas.
- Verificar se os efeitos do isolamento social de 7 dias na memória social são sexualmente dimórficos.
- Analisar se o isolamento social altera a quantidade de interneurônios na região de CA2 e se existe diferenças entre os sexos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Todos os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Nº do protocolo: 150/2022) (Anexo)

Foram utilizados como animais experimentais camundongos machos e fêmeas da linhagem C57/BJ6 com idade entre oito e doze semanas e como animais estímulos camundongos juvenis com idade entre 21 a 32 dias como estímulo social para os testes comportamentais. Com intuito ético de diminuir a quantidade de animais submetidos a experimentação, quanto atingida a idade adulta, os animais juvenis utilizados como estímulos sociais também foram usados como animais experimentais.

Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica em gaiolas padrão (30X20X13cm), com no máximo cinco animais por gaiola, dentro de uma estante com temperatura ambiente de $22\pm1^{\circ}\text{C}$, umidade entre 40-70%, ciclo claro-escuro de 12/12 horas e receberão comida e água *ad libitum*. Os animais socialmente isolados foram alojados individualmente em uma gaiola padrão com o uso de microisolador por um período de 7 dias nas mesmas condições descritas acima.

4.2 Cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias

Para implantação das cânulas guias na região de CA2 do hipocampo, os animais foram anestesiados com Isoflurano (indução:5%; manutenção:1-5%) e posicionados no aparelho estereotáxico. Para a manter a anestesia gasosa durante a cirurgia, foi utilizado um vaporizador universal (IFAB - Materiais hospitalares, São Paulo, Brasil) onde o Isoflurano foi colocado em líquido, vaporizado e misturado com oxigênio para ser bombeado ao longo de um tubo. No terminal deste tubo há um suporte que permite o encaixe do focinho do animal. O Vaporizador conta com válvulas que permitem o ajuste da mistura de Isoflurano com o oxigênio. Para evitar o ressecamento dos olhos durante a cirurgia, os olhos foram lubrificados com salina 0,09%, já que estes animais não os fecham quando anestesiados. Ao detectarmos a ausência de resposta reflexa ao pinçar das patas, a região da cabeça foi tricotomizada e higienizada com 3 repetições de iodopovidona (PVPI 10%) seguida de etanol 70%, usando um cotonete. Em seguida, uma injeção subcutânea de lidocaína diluída a 0,5%

com soro fisiológico em uma concentração de 5mg/Kg foi administrada e após alguns minutos o crânio foi exposto através de uma incisão com bisturi. O perióstio foi removido, o bregma e o lambda foram alinhados. O bregma foi a referência para as coordenadas (adaptadas de PAXINOS) utilizadas para a implantação das cânulas guias em CA2 (em mm: AP -2.00; LL $\pm$ 2.30; DV -1.67). Foi realizada a trepanação bilateral utilizando uma broca odontológica nos locais correspondentes às coordenadas anteroposteriores (AP) e látero-laterais (LL). As cânulas guias (22G, 7mm) foram colocadas num adaptador fixado à torre do estereotáxico e foram abaixadas lentamente através dos orifícios abertos anteriormente até atingirem a coordenada dorso-ventral (DV). As cânulas foram fixadas com cimento de zinco e em seguida o adaptador foi retirado. Uma cânula oclusora foi colocada no interior de cada cânula guia para evitar o entupimento. Dois parafusos foram fixados sobre a calota craniana no osso frontal para aumentar a fixação do capacete. A região do crânio exposta foi coberta por resina acrílica formando um capacete. Após o procedimento cirúrgico os animais foram alocados em suas caixas, receberam administração de soro ringer lactato (10mL/kg;s.c) num volume de 0.25mL e uma dose intramuscular de Tramadol 5mg/kg, considerando o peso médio do camundongo adulto como 25g. Aguardamos 7 dias para que os animais se recuperem do procedimento cirúrgico. Logo após, os animais são submetidos a tarefa de reconhecimento social (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019; PEREIRA et al., 2019; GUARNIERI et al., 2020; GUSMÃO et al., 2012; MONTEIRO et al., 2014) após infusão de drogas.

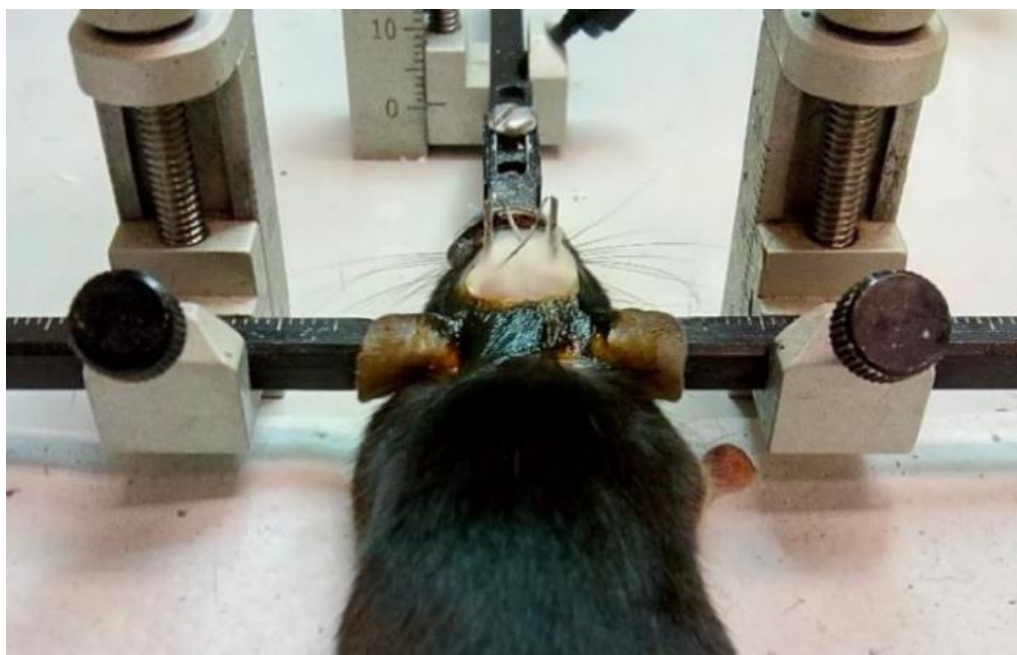


Figura 7 - Cirurgia estereotáxica. Implantação de cânulas em CA2 em camundongos C57BL6.

4.3 Verificação do posicionamento das cânulas e eletrodos

As fatias obtidas dos cérebros dos animais que passarão pela cirurgia estereotáxica serão coradas com vermelho neutro e observadas na lupa. Foram utilizados nas análises finais somente os animais que tiveram a presença das cânulas guias confirmadas na região de CA2.

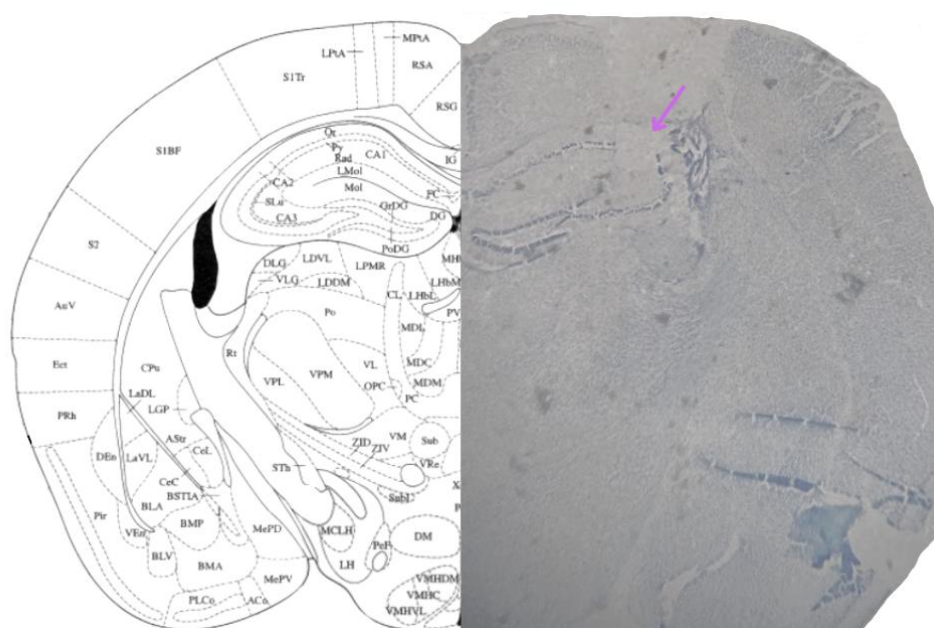


Figura 8 - Corte histológico para verificação do posicionamento das cânulas-guia, cujo alvo foi o cornus ammonis 2 (CA2). A seta indica o alvo da injeção.

4.4 Testes Comportamentais

4.4.1 Tarefa de Preferência por Novidade Social (PNS)

Para avaliar o comportamento social afiliativo e a tendência pelo estímulo social novo, adaptamos o protocolo de PNS desenvolvido por Moy et al, (2003) da câmara de 3 compartimentos. Em suma, o teste consiste em quantificar o tempo que um animal experimental passa investigando socialmente um animal desconhecido e um familiar em um aparato dividido em 3 compartimentos.

Antes do início do teste todos os animais foram aclimatados ao ambiente onde o teste foi realizado por pelo menos 1 hora com acesso a água e bebida *ad libitum* e a uma incidência luminosa de 10 lux. Antes de iniciar a tarefa os animais estímulos foram habituados por 10 minutos aos cilindros onde foram apresentados aos animais experimentais.

Os animais experimentais foram deixados explorando livremente a caixa de 3 compartimentos durante 20 minutos com os cilindros metálicos vazios posicionados nos compartimentos esquerdo e direito durante o período de habituação. Passado o período de habituação, o animal era posicionado no compartimento central e o acesso aos compartimentos laterais era restringido por tampas para que os animais que serviriam de estímulos sociais fossem posicionados. Então, em cada lado da caixa foi colocado dentro de um cilindro um animal desconhecido e outro familiar da mesma caixa, sendo estes do mesmo sexo e idade aproximada do animal experimental. Para evitar vieses os lados em que os animais familiar e novidade foi sendo alternado entre um animal experimental e outro. Em seguida, as tampas foram retiradas e foi contabilizado o tempo que o animal experimental passa explorando socialmente os animais novidade e familiar durante o período de 5 minutos.

Para avaliar a capacidade de distinção entre a novidade social e um estímulo social conhecido, compara-se o tempo em que o animal experimental explora os indivíduos novos e o indivíduo familiar. Em condições naturais, os animais preferem explorar o estímulo que apresenta uma novidade para eles. Logo, espera-se que os animais passem mais tempo explorando a novidade do que o familiar da mesma caixa. São desconsiderados da análise final que passaram por intempéries durante as

sessões do teste, como fuga do animal juvenil ou experimental, comportamentos anormais repetitivos, animais em sofrimento aparente, interrupções durante o teste que alterassem o comportamento significativamente etc. Todo o experimento foi gravado.

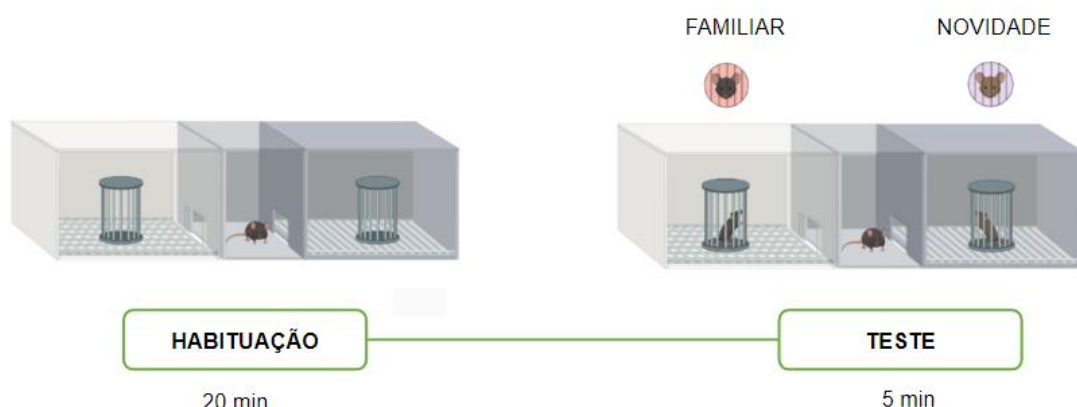


Figura 9 – Esquema do teste de preferência social que visa avaliar a predileção de um camundongo experimental entre investigar um estímulo social novo em comparação com um outro familiar, normalmente roedores tendem a preferir a novidade social. Em um primeiro momento o animal experimental é habituado livremente a caixa de três compartimentos durante 20 minutos. Ao final deste tempo, as portas dos compartimentos laterais são fechadas e o animal experimental fica restrito ao compartimento central enquanto um animal familiar e outro novo são acondicionados dentro dos cilindros nos compartimentos opostos. Logo após, começa a fase de teste onde as portas são reabertas e o animal é livre para explorar durante 5 minutos os estímulos sociais. A preferência é testada pelo tempo que o animal explora socialmente cada um dos animais familiares e novidades.

4.4.2 Tarefa de Reconhecimento Social (RS)

Para avaliar a memória social foi utilizado um modelo de tarefa de reconhecimento social adaptado de Thor e Holloway (1982), denominado Paradigma Residente-Intruso. O experimento consiste na inserção de um animal juvenil (intruso) na caixa de um animal adulto (residente) a fim de que se quantifique o tempo de exploração social.

Antes do início do teste todos os animais foram aclimatados ao ambiente onde o teste foi realizado por pelo menos 1 hora com acesso a água e bebida *ad libitum*. Na etapa inicial o animal residente será habituado a gaiola e ao cilindro metálico vazio por 20 minutos a uma incidência luminosa de 10 lux. Imediatamente após a

habituação, foi iniciada a sessão de treino (TR), onde o animal juvenil foi colocado no interior do cilindro por 5 minutos. Durante todo o treino, foi contabilizado com o auxílio de um cronômetro digital de mão o tempo de investigação social (consideramos investigação social o tempo que o animal adulto mantém o focinho e as vibrissas nos orifícios do cilindro). A memória de longa duração foi testada 24 horas após o treino na sessão de teste (TT), onde todo o procedimento do TR é repetido tendo o tempo de investigação social também contabilizado durante 5 minutos (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019; GUARNIERI et al., 2020; GUSMÃO et al., 2012; MONTEIRO et al., 2014).

Em condições naturais, espera-se que o tempo de investigação do animal intruso pelo residente diminua no segundo encontro quando comparado ao primeiro, já que camundongos apresentam o comportamento inato de investigar mais aquilo que é novidade. Se houver uma diminuição estatística no tempo de exploração entre o momento de apresentação do juvenil (TR) e o tempo de teste (TT), considera-se que o animal residente reconhece o intruso. Isso significa que o tempo de investigação durante o teste é menor. Por outro lado, se o tempo for semelhante, conclui-se que o animal não se lembra do juvenil apresentado 24h antes.

São desconsiderados da análise final animais que exploraram menos de 20 segundos no TR, pois considera-se que este tempo não é suficiente para formação da memória social. Foram excluídos também animais que passaram por intempéries durante as sessões do teste, como fuga do animal juvenil ou experimental, comportamentos anormais repetitivos, animais em sofrimento aparente, interrupções durante o teste que alterassem o comportamento significativamente etc. Todo o experimento foi gravado.



Figura 10 – Esquema da tarefa de reconhecimento social. No primeiro dia da tarefa, ocorre a habituação do animal experimental durante 20 min ao aparato no qual será realizado o teste, em

seguida, durante a sessão de treino, o estímulo social é inserido no cilindro e pode ser investigado por 5 min. A memória social de longo-prazo é testada 24h depois em uma sessão de teste que é idêntica ao treino e precedida pela habituação.

4.5 Administração de droga

4.5.1 AM251

AM251 é uma droga utilizada em estudos sobre os efeitos gerados pelo sistema endocanabinóide, já que é uma droga com mecanismo de ação do tipo antagonista seletivo com grande afinidade para os receptores canabinóides CB1. Ao ocupar esses receptores o AM251 impede a ligação de outras substâncias ao sítio de ligação, resultando no bloqueio da ação de endocanabinóides relacionados com os receptores CB1. Utilizamos o AM251 para avaliar o papel da sinalização de endocanabinóides ligados aos receptores de CB1 na região de CA2 durante a evocação da memória social.

Para isso, foi injetado o volume de 0,25 µl bilateralmente (0,5 µl/por animal) com auxílio de uma cânula injetora (30G, 12mm), acoplada a um tubo de polietileno e à uma seringa Hamilton de 5µl. A droga foi preparada dissolvendo AM251 em uma solução veículo contendo 80% Salina 0,09%, 10% DMSO e 10% Cremophor.

A injeção ocorreu 30 minutos antes do teste de reconhecimento social, onde os animais foram gentilmente contidos para inserção da mangueira de injeção nas cânulas guia. Após cada injeção, esperamos pelo menos 60 segundos para retirar a mangueira para garantir que todo conteúdo foi entregue. Os animais controle receberam o mesmo volume de injeção contendo somente a solução veículo. Ambas as soluções foram preparadas no mesmo dia do uso.

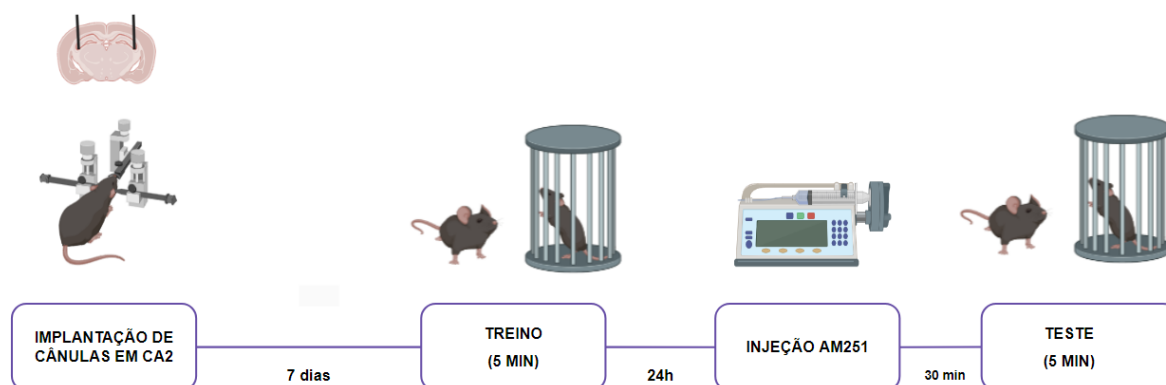


Figura 11 – Esquema explicativo do processo de injeção seguido da tarefa de reconhecimento social. As cânulas guias são implantadas na região de CA2 através da cirurgia estereotáxica. Após 7 dias de

recuperação os animais são submetidos a tarefa de reconhecimento social, sendo que o AM251 é injetado 30 minutos antes da sessão de teste.

4.6 Imunofluorescência (IF)

Após o fim dos experimentos comportamentais, os animais passaram pela perfusão intracardíaca. Para isso, eles receberam injeção intraperitoneal com cetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e tiveram a sensibilidade à dor averiguada pelo reflexo de retirada da pata. Na ausência de sensibilidade, o coração foi perfundido com 20 mL de tampão fosfato e salina 0,01M (PBS 0,01M: Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, NaCl 137mM, KCl 2,7mM; pH=7.4) seguidos de formaldeído 4% (m/v) em PBS 0,01M (PFA 4%).

Imediatamente após a perfusão, os cérebros foram removidos e armazenados em PFA 4% entre 12-24h. Em seguida, eles foram transferidos para uma solução de sacarose 30% (m/v) em PBS 0,01M, onde permaneceram até serem fatiados.

Com o auxílio de um criostato, foram obtidas fatias de 40µm das regiões (colocar a referência e imagem do início e fim de CA2 do Paxinos). As fatias foram armazenadas em solução crioprotetora (sacarose 30% m/v, polivinilpirrolidona PVP 1% m/v, PBS 0,01M 50% v/v e etileno glicol 30% v/v) até a realização da IF.

A Imunofluorescência foi realizada em placas de 16 poços, sendo 1 poço para cada animal, contendo 12 fatias de hipocampo selecionadas seguindo o método estereológico de Sterio (1984). Os processos foram realizados com o auxílio de um agitador em velocidade mínima, fora quando explicitado todos os processos foram feitos em temperatura ambiente. Primeiramente, as fatias passaram por dois processos de lavagens, a primeira com 10 lavagens de 6 minutos em PBS 0,01M e a segunda com 1 lavagem de 15 minutos em Borohidreto de Sódio (NaBH₄) 0,01M. Em seguida, foi realizado o bloqueio de sítios de ligações inespecíficas utilizando BSA 3% diluído em PBS-T 0,03% durante 60 minutos, sucedido por mais 10 lavagens de PBS 0,01 M. Logo após, foi realizada a incubação overnight a 4°C com os anticorpos primários mouse anti-GAD-67 na concentração de 1:500 ul (Sigma, MAB5406) e rabbit anti-PCP4 na concentração de 1:200 ul (Sigma, HPA005792). Ao término do overnight, as fatias passam por mais 5 lavagens de 6 minutos com PBS 0,01M. Após esta etapa, todos os procedimentos foram feitos na penumbra, evitando luz direta nos tecidos para preservar os fluoróforos. Dando sequência, as fatias são incubadas durante 120 minutos com os anticorpos secundários Alexa 568 anti-mouse (inserir

marca) e Alexa 488 anti-rabbit (inserir marca), ambos na concentração de 1:1000 diluídos na solução de bloqueio. Dando continuidade, as fatias passaram por mais 5 lavagens com PBS 0,01M e uma lavagem com DAPI. Após o processo, as fatias foram deixadas secando, em seguida foram montadas em lâminas magnetizadas positivamente carregadas (Superfrost® Plus) cobertas por meio de montagem fluoromount™ e vedadas com esmalte acrílico. Por fim, as lâminas montadas foram armazenadas em um recipiente protegido da luz a 4°C.

4.7 Aquisição das imagens

A região CA2 dos hipocampus dorsal e ventral foram fotografadas em ampliações de 10X, 20X e 40X usando o microscópio de luz AxioImager M2-Zeiss System. Filtros específicos foram utilizados para cada comprimento de excitação dos fluoróforos, juntamente com o software Carl Zeiss Axiovision 4.8.

Para capturar as imagens, foram padronizados os parâmetros de aquisição (tempo de exposição, ganho digital, brilho e contraste) para garantir uma ampla gama de intensidades de sinal. Esses parâmetros foram estabelecidos com base em amostras adicionais, sem afetar a obtenção do sinal das amostras experimentais, e foram mantidos consistentes ao longo de todas as capturas de imagens. Todas as imagens capturadas foram salvas no formato ZVI.

4.8 Análise das imagens

O marcador DAPI e PCP4 foram usados para identificar a região de CA2 nas imagens capturadas com uma objetiva de 20X, sendo o PCP4 para as fibras musgosas que delimitam a área e o DAPI para o núcleo das células. Damos seguimento às análises no software ImageJ, todas as imagens foram ajustadas para uma escala com base nos valores de correção do software Carl Zeiss Axiovision 4.8 ($\mu\text{m}/\text{pixel}$). A área correspondente a CA2 foi delineada, e a autofluorescência de fundo foi removida em todas as imagens. Depois disso, as imagens foram convertidas para 8 bits, e a sobreposição entre GAD67 e PCP4 foi calculada usando o plugin colocalization threshold. Os resultados foram apresentados em partículas por micrômetro quadrado, considerando a área total analisada.

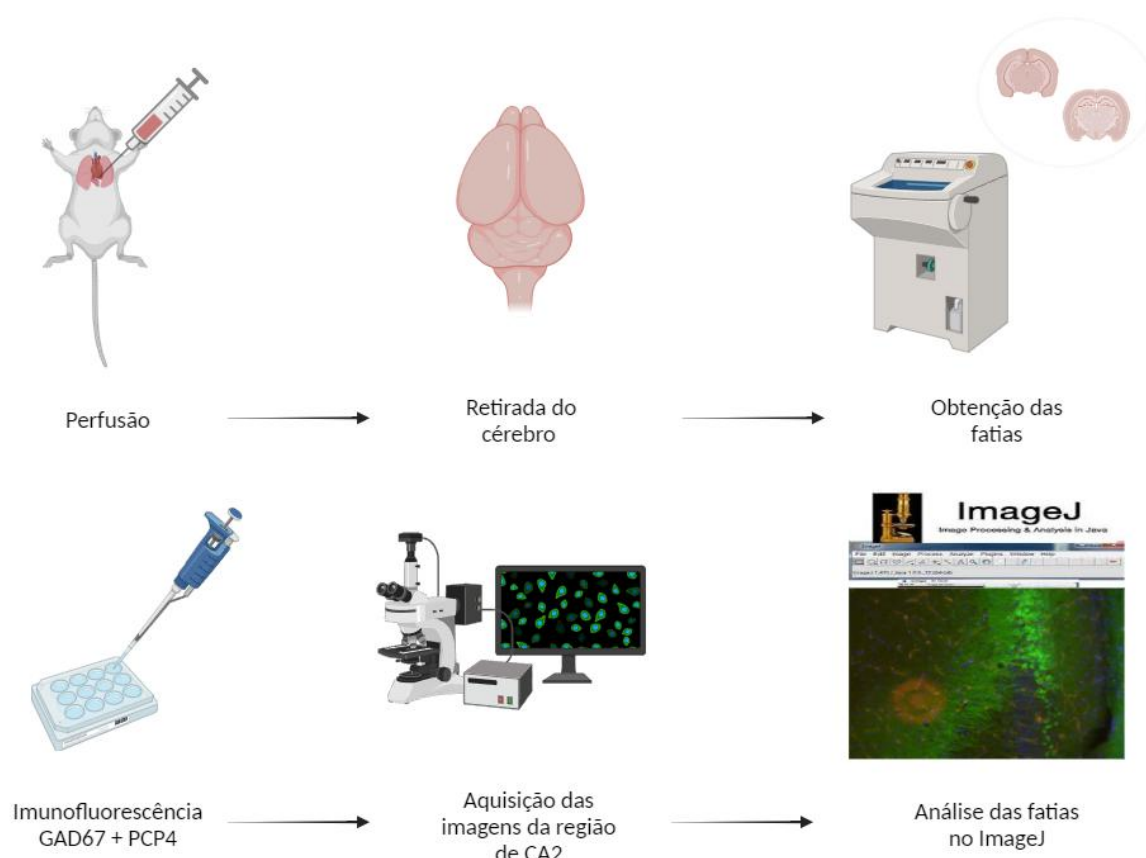


Figura 12 - Sequência de métodos para a quantificação de GAD67 e PCP4 em CA2. neurogênese. Os animais foram anestesiados e passaram pela perfusão cardíaca seguida de retirada dos cérebros. Posteriormente, com o auxílio do criostato, foram obtidas fatias contendo a região de CA2 do hipocampo dorsal e ventral. Essas fatias foram utilizadas para o ensaio de imunofluorescência (IF) anti-PCP4 e anti-GAD67, proteínas presentes em fibras musgosas de CA2 e interneurônios, respectivamente. Mais tarde, a região de CA2 foi fotografada com o auxílio de um microscópio no aumento de 20x. Foi analisado o número de células marcadas de ambas as proteínas / área com o auxílio do software ImageJ.

4.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov no *software* Graphpad Prism 9. Sendo que todos os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e considerando o nível de significância $\alpha=0,05$. Para avaliar as diferenças entre os grupos e os efeitos de tratamentos foi utilizada a análise de variância de três vias (Three way ANOVA) ou de duas vias, seguida pelo *Post hoc* Bonferroni. Para comparações dentro do mesmo grupo foi utilizado a análise de variância de uma via (One way ANOVA). A comparação direta entre dois grupos foi realizada utilizando um teste t não pareado.

5. RESULTADOS

5.1 Camundongos C57Bl6 machos e fêmeas apresentam preferência por novidade social

A fim de estudar déficits em interações sociais em modelos animais de autismo, Moy et al (2003) desenvolveu um teste comportamental capaz de mensurar a preferência por novidade social em camundongos, baseado na predileção inata de murinos em explorar o que é novo. Mesmo sendo um teste amplamente utilizado, ainda há controvérsias sobre sua eficácia em algumas linhagens de camundongos (Moy et al., 2004; Pearson et al., 2010), além de poucos estudos que contenham resultados obtidos em fêmeas (Shirenova et al., 2023). Sendo assim, comparamos a preferência por novidade social em camundongos machos e fêmeas da linhagem C57/BL6, com o intuito de observar se a expressão do comportamento de preferência por novidade social é sexo dependente.

Quantificamos quanto tempo o animal experimental passa investigando um animal estímulo familiar da mesma caixa e o outro animal não conhecido, sendo ambos coespecíficos do mesmo sexo e com idade aproximada. Os resultados também foram analisados utilizando o teste ANOVA de duas vias com *Post hoc* Bonferroni de múltiplas comparações para verificar se há efeito do sexo no tempo de exploração dos animais. Nesta análise foi demonstrado que tanto fêmeas ($p = 0,0056$) quanto machos ($p = 0,0021$) apresentam diferença no tempo de exploração entre os indivíduos, sendo que ambos apresentaram preferência pelo animal desconhecido (Figura 1).

Não foram identificados nos resultados efeitos do sexo quando comparada a média entre os grupos de machos e fêmeas. Houve diferença no tempo de exploração ($F [1, 12] = 31,82$; $p = 0,0001$) e na relação do tempo de investigação social entre novidade e familiar ($F [12, 12] = 3,298$; $p = 0,0244$). Portanto, pode-se afirmar que camundongos machos e fêmeas apresentam preferência por novidade social de maneira não dependente do sexo.

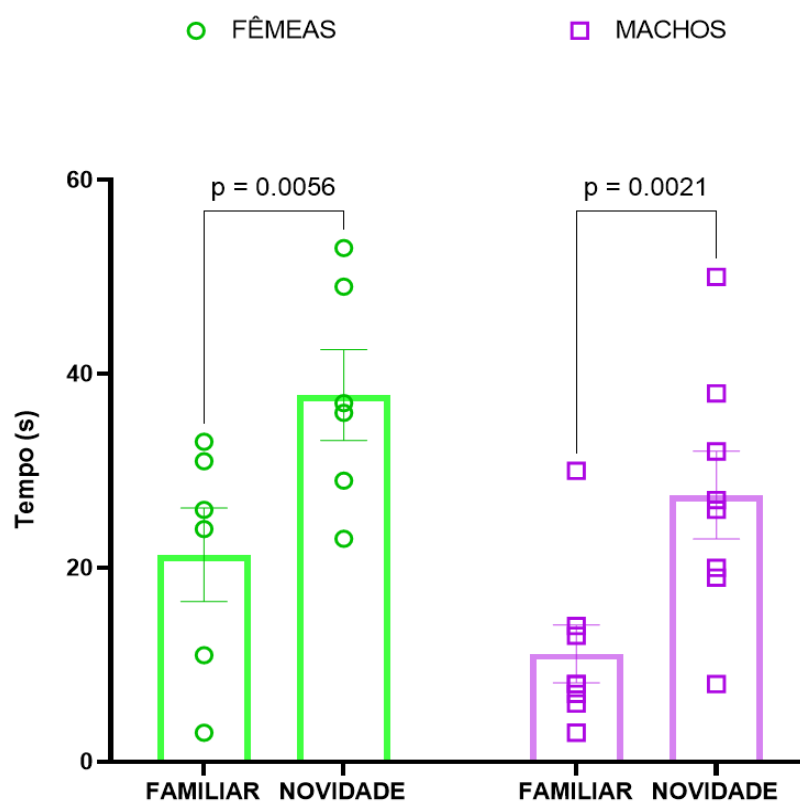


Figura 13 - De forma similar, machos e fêmeas apresentam preferência por novidade social. Já que passam mais tempo interagindo socialmente com camundongos um camundongo do mesmo sexo desconhecido do que com um já familiarizado pertencente a mesma caixa. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

Por seguinte, nos perguntamos se o tempo em que o animal experimental passou investigando os estímulos, tanto familiar quanto novidade, era igual entre os sexos. Para isso, utilizamos um teste t não pareado para comparar as médias do tempo total de exploração. Os resultados demonstram que existe uma diferença entre machos e fêmeas na quantidade de tempo despendido investigando socialmente os outros sujeitos durante a tarefa comportamental (Figura 2) ($p = 0,0410$, $t(27) = 2,146$), sendo que as fêmeas apresentam um tempo de exploração maior quando comparada com os machos.

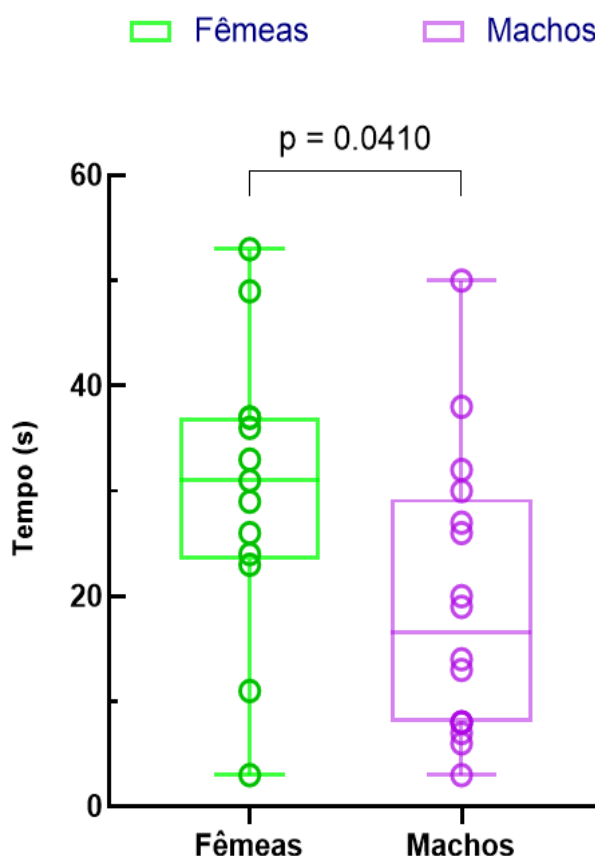


Figura 14 – Teste T comparando machos e fêmeas em relação a quantidade de tempo total de investigação durante o teste. Em média, as fêmeas passaram mais tempo investigando socialmente os estímulos sociais, tanto novidade quanto familiar, quando comparadas com os machos durante a tarefa. Média das fêmeas (19,31) e machos (30,15); Diferença entre médias $10,84 \pm 5,052$.

5.2 Camundongos C57Bl6 machos e fêmeas agrupados são capazes de formar MS de maneira semelhante

Após confirmarmos que ambos os sexos apresentam preferência por novidade social de maneira semelhante, nos perguntamos se os animais apresentavam MS ao serem submetidos ao paradigma de reconhecimento social (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019; GUARNIERI et al., 2020; GUSMÃO et al., 2012a; MONTEIRO et al., 2014; THOR, HOLLOWAY., 1982) que depende do comportamento inato de preferência por novidade social.

Foi utilizado nas análises estatísticas o teste ANOVA de duas vias com *Post hoc* Bonferroni, tendo-se como variáveis o tempo de investigação do juvenil nas sessões da tarefa e o sexo dos animais. Verificamos que o tempo gasto explorando o animal juvenil em machos ($p = 0.002$) e fêmeas ($p=0.005$) na sessão de teste foi menor

quando comparado com a sessão de treino nos camundongos machos e fêmeas. O teste não encontrou efeito do sexo nos resultados obtidos.

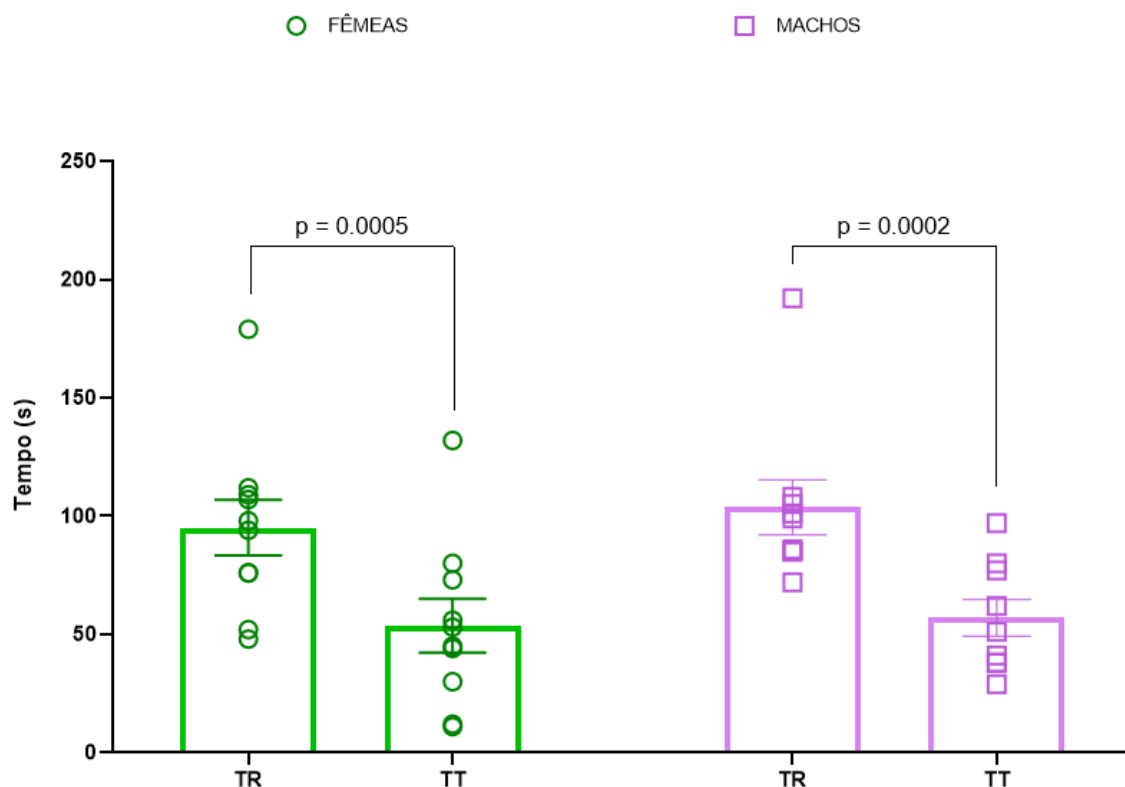


Figura 15 – Camundongos C57/B6 machos e fêmeas apresentam MS. ANOVA de 2 vias do tempo de investigação dos juvenis durante o TR e TT de machos e fêmeas. Durante o TT de ambos os grupos o tempo de investigação foi menor quando comparado com o TR, demonstrando assim que os animais lembraram do juvenil apresentado 24h antes do TT. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

Investigamos também através de um teste-t não pareado se havia diferença entre machos e fêmeas no tempo total gasto investigando o juvenil durante toda a tarefa, ou seja, somando o tempo do TR e TT. Não foi encontrada diferença ($p=0,6451$) entre os grupos, indicando que machos e fêmeas não diferem no tempo gasto investigando os juvenis.

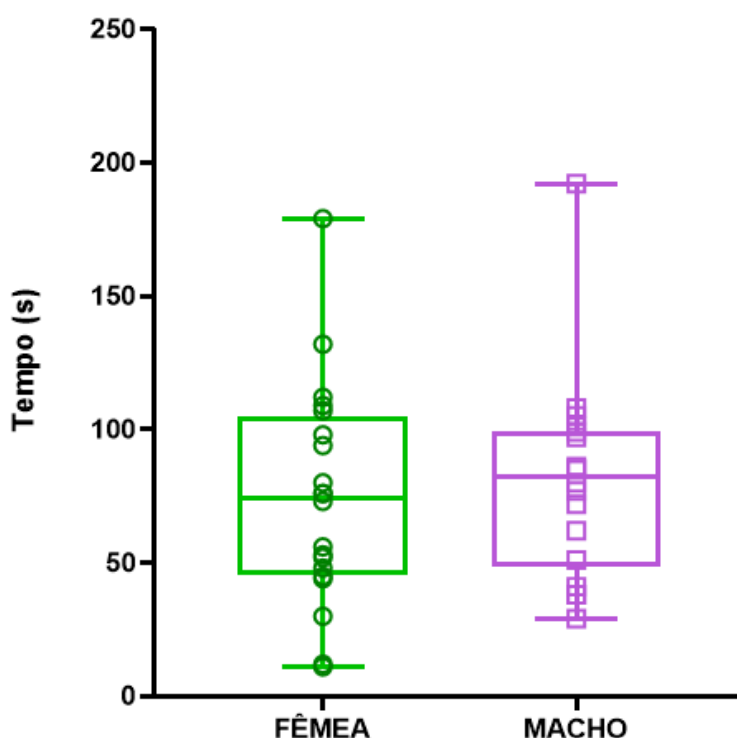


Figura 16 – Comparação entre o tempo de exploração de fêmeas e machos para avaliar interesse pela interação social. O teste t não pareado não encontrou diferenças no tempo de investigação total, soma do TR e TT, entre os grupos machos e fêmeas. Mostrando assim, que ambos os grupos investigaram os juvenis por períodos semelhantes.

5.3 Diminuição na inibição de interneurônios através do bloqueio de receptores CB1 na região de CA2 do hipocampo de camundongos machos e fêmeas agrupados impede a evocação da memória social

Tendo em vista os resultados anteriores de que o IS reduz a liberação de GABA em CA2, nos perguntamos se a diminuição da inibição de interneurônios na região prejudicaria a evocação da MS em camundongos agrupados. Os estudos de Loyse et al. (2022), demonstraram que a sinalização endocanabinóide através de receptores CB1 em CA2 é primordial para a formação da MS. A ativação dos receptores CB1 induz LTD nos interneurônios da área, diminuindo a inibição de CA2, o que torna os neurônios piramidais da região propensos a disparar potenciais de ação.

Por isso, avaliamos o papel da inibição na região utilizando o bloqueador de receptores endocanabinóides CB1 AM251 durante a evocação da memória social e submetemos os animais a tarefa de reconhecimento social.

Neste experimento os animais receberam uma injeção contendo salina ou AM251 na região de CA2 30 minutos antes da realização da fase de teste. Logo após, os animais foram sacrificados e a posição das cânulas confirmadas. Submetemos os resultados a análise ANOVA de três vias para com *Post hoc* Bonferroni de múltiplas comparações. O teste comparou o efeito do tratamento na diferença do tempo de exploração entre o treino e o teste dos animais.

Neste conjunto de dados consideramos na análise machos e fêmeas como um grupo único grupo, já que o n amostral de cada grupo está baixo e segundo resultados apresentados anteriormente (Figura 15) ambos os sexos são capazes de realizar a TRS sem especificidade de sexo. Utilizamos o teste ANOVA de duas vias com *Post hoc* Bonferroni de múltiplas comparações. Nossos dados demonstram que a injeção de AM251 prejudicou a evocação da memória social ($p > 0.9999$). Assim como o esperado, os animais que receberam injeção de salina foram capazes de formar e evocar a memória social ($p = 0.0008$). Foi identificado também interação entre Tratamento x TR/TT [$p = 0.0086$; $F(3, 8) = 8,001$]

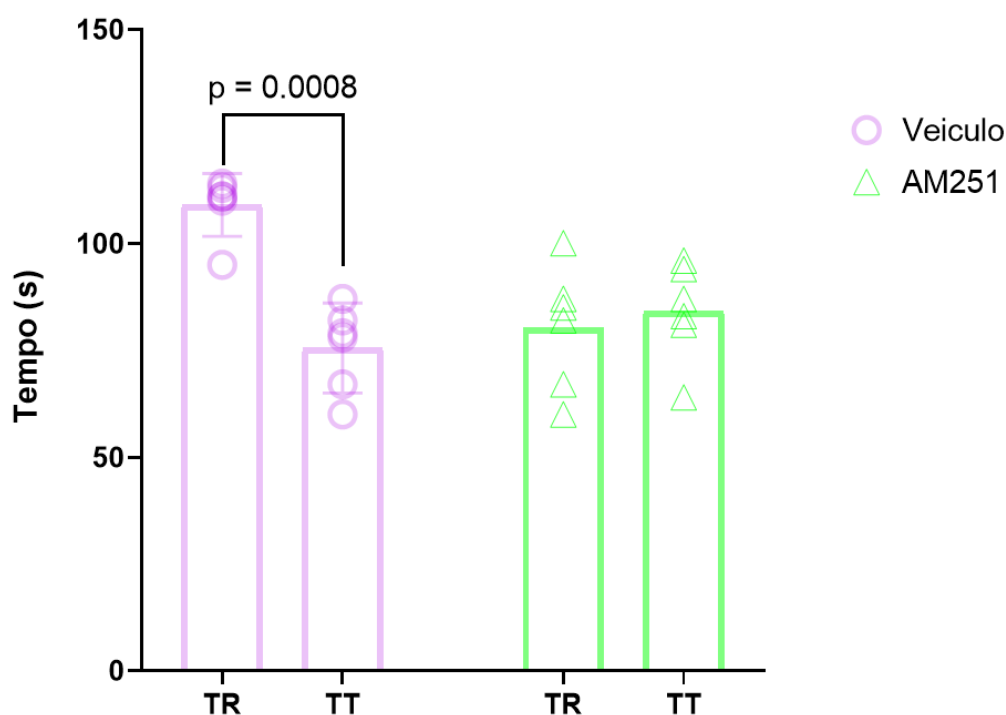


Figura 17 – O bloqueio de receptores CB1 por AM251 na região de CA2 impede a evocação da memória social em camundongos. Os animais que receberam injeção de veículo em CA2 apresentam a MS, ou seja, investigam por um tempo menos o juvenil durante o TT. De forma diferente, os animais que receberam AM251 30 minutos antes do teste não foram capazes de evocar a memória social, apresentando uma exploração semelhante no TR e TT. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

Este conjunto de resultados sugere que o bloqueio de receptores CB1 em CA2 impedem a evocação da MS em camundongos machos e fêmeas, logo os endocanabinóides são um fator importante na formação da memória social.

5.4 O isolamento social de 7 dias prejudica a memória social em camundongos C57/J6 machos e fêmeas de maneira semelhante

Dados anteriores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa já demonstravam que o isolamento social é uma condição prejudicial a MS de camundongos machos C57/J7, porém o efeito do IS era desconhecido em fêmeas.

Para verificar o efeito do isolamento social na memória social nos grupos de machos e fêmeas, foi realizado o teste ANOVA de três vias com análise *Post hoc* Bonferroni de múltiplas comparações. Foi observado que os animais isolados por 7 machos não apresentam a MS, logo, o tempo de exploração durante o treino e teste foram semelhantes em camundongos machos ($p = 0,3058$) e fêmeas ($p = 0,1693$) (Figura 3 - A). Em contrapartida, os camundongos que permaneceram agrupados apresentaram diferença no tempo de exploração durante as sessões da tarefa, sendo assim podemos considerar que este grupo de fêmeas ($p = 0,0005$) e machos ($p = 0,0002$) são capazes de formar MS (FIGURA 3). Corroborando com os achados acima, os testes estatísticos detectaram efeitos de interação entre condição social x tempo de exploração TR e TT [$F(1, 35) = 6,742$; $p = 0,0137$]. Porém, não foi encontrado nenhum efeito de interação relacionado ao sexo.

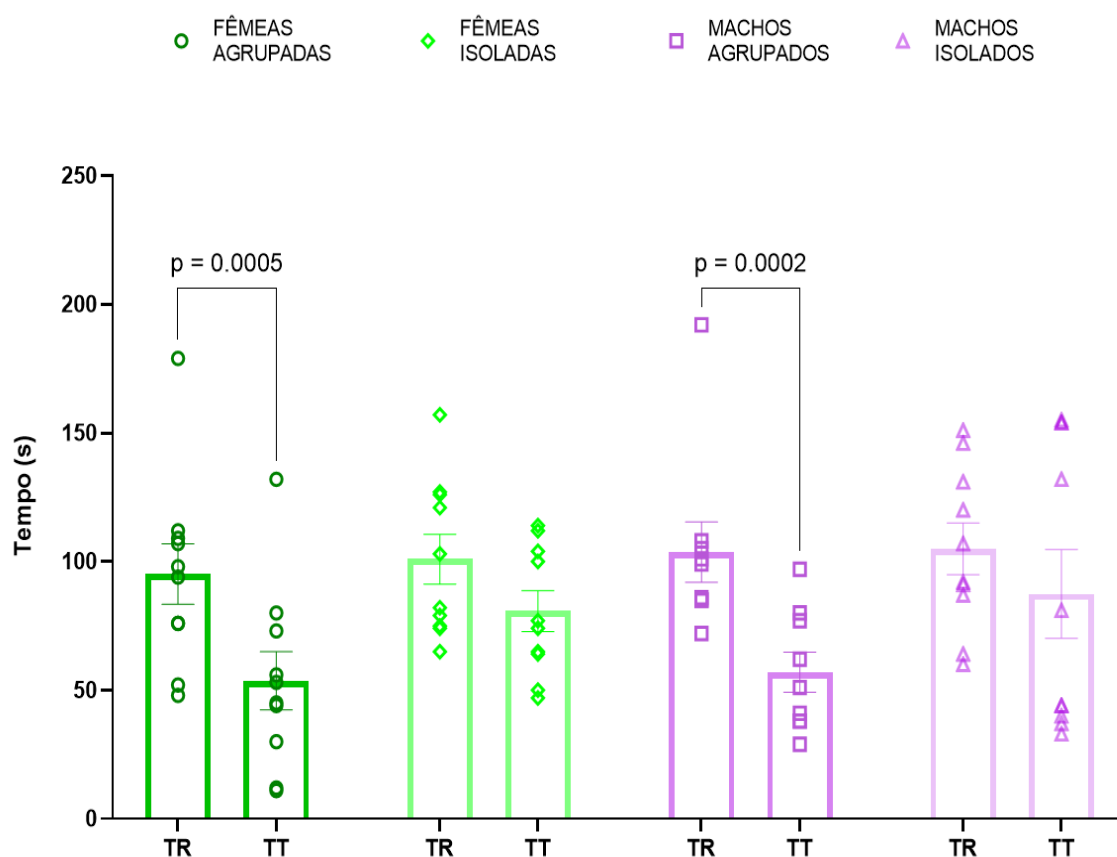


Figura 18 - O IS de 7 dias prejudica a MS de maneira sexo não dependente. O período em que os animais isolados exploraram os juvenis durante o TR e TT é semelhante, enquanto os animais agrupados (dados já mostrados na figura 3) apresentaram diferença entre as sessões. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

Dando sequência, testamos se havia diferença entre os grupos na quantidade total de tempo que os animais passaram explorando o juvenil durante a TRS. Para isso, utilizamos um ANOVA uma via com Post hoc Bonferroni para comparar a média de cada grupo. Segundo nossas análises não há diferença no tempo de exploração total entre os grupos, indicando que o isolamento e o sexo não afetaram o interesse pela exploração social.

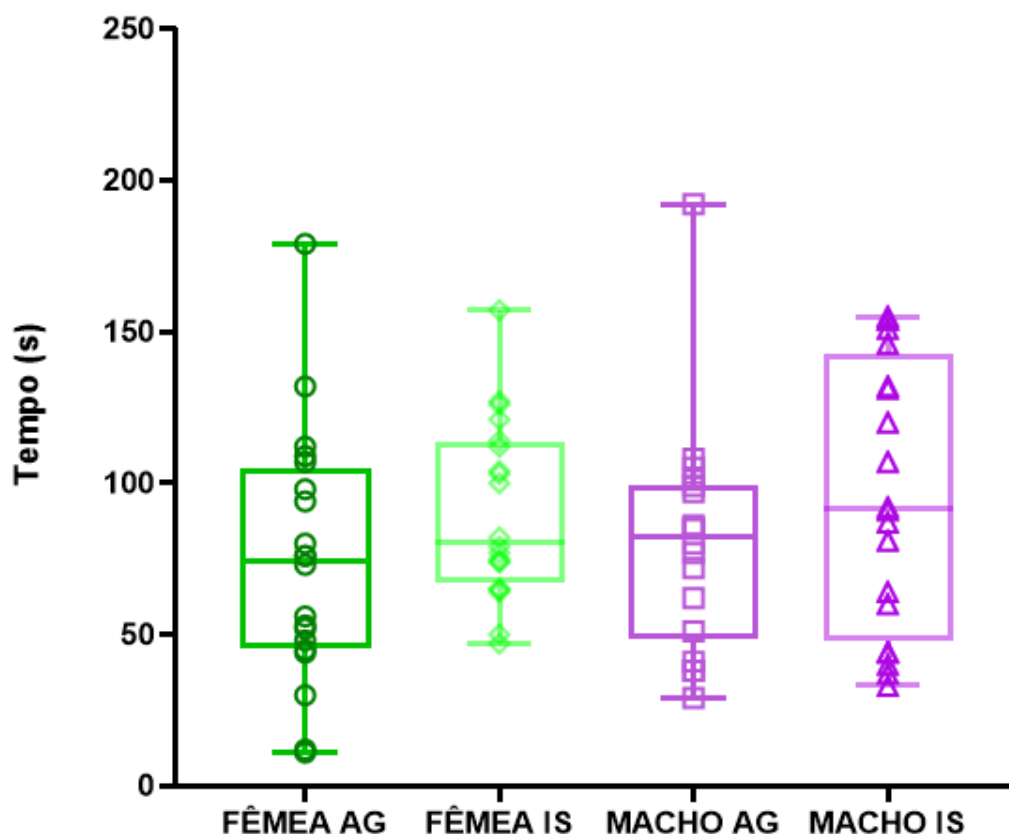


Figura 19 – Fêmeas (AG e IS) e machos (AG e IS) apresentam interesse semelhante pelos juvenis. Em média, não houve diferença estatística no tempo de investigação social total (TR+TT) entre os grupos.

Dessa forma, podemos concluir que os efeitos prejudiciais do isolamento social de 7 dias não são sexo dependentes. Ademais, não existe diferença no tempo de exploração total entre os grupos, indicando que o interesse pela exploração não foi afetado.

5.5 O isolamento social reduz a liberação de GABA nas fibras musgosas da região de CA2 do hipocampo de machos

Sendo o isolamento um fator prejudicial a MS e a região de CA2 crucial para a formação desta memória, investigamos se o isolamento é capaz de alterar a neurotransmissão inibitória da área. Em conjunto, avaliamos também se as alterações são sexo dependentes, já que CA2 apresenta uma morfologia distinta entre os sexos, mas sem funcionalidade descrita.

Para este fim, utilizamos uma dupla marcação com GAD67 (Glutamato Descarboxilase) e PCP4 (Proteína 4 da célula de Purkinje). O GAD67 é

frequentemente empregado na identificação de neurônios inibitórios GABAérgicos graças a sua capacidade de marcar parte da maquinaria de síntese do neurotransmissor GABA. O PCP4 é um modulador de atividade da calmodulina que, apesar da sua presença abundante em células do cerebelo, também é amplamente expresso no hipocampo, principalmente em CA2 e na camada granular do giro dentado (Lein et al., 2004, 2005). Com isso, San Antonio et al. (2014) validou o uso do anticorpo como um marcador molecular eficiente na demarcação da região de CA2, devido a sua reatividade específica com as fibras musgosas da região. Na análise, utilizamos o teste ANOVA de duas vias para comparar os grupos. Foi quantificado a quantidade de células positivas para GAD67 colocalizadas com neurônios marcados com PCP4 e dividido pelo tamanho da área marcado.

De maneira surpreendente, foi observado que o isolamento reduz a quantidade de interneurônios colocalizados com as fibras musgosas na região de CA2 em machos ($p = 0,0005$), mas não em fêmeas ($p = 0,3903$). Este resultado sugere que o isolamento reduz a inibição das fibras musgosas de CA2 de machos. Demonstrando que o IS afeta a região de CA2 de camundongos machos e fêmeas de maneira sexualmente diferenciada.

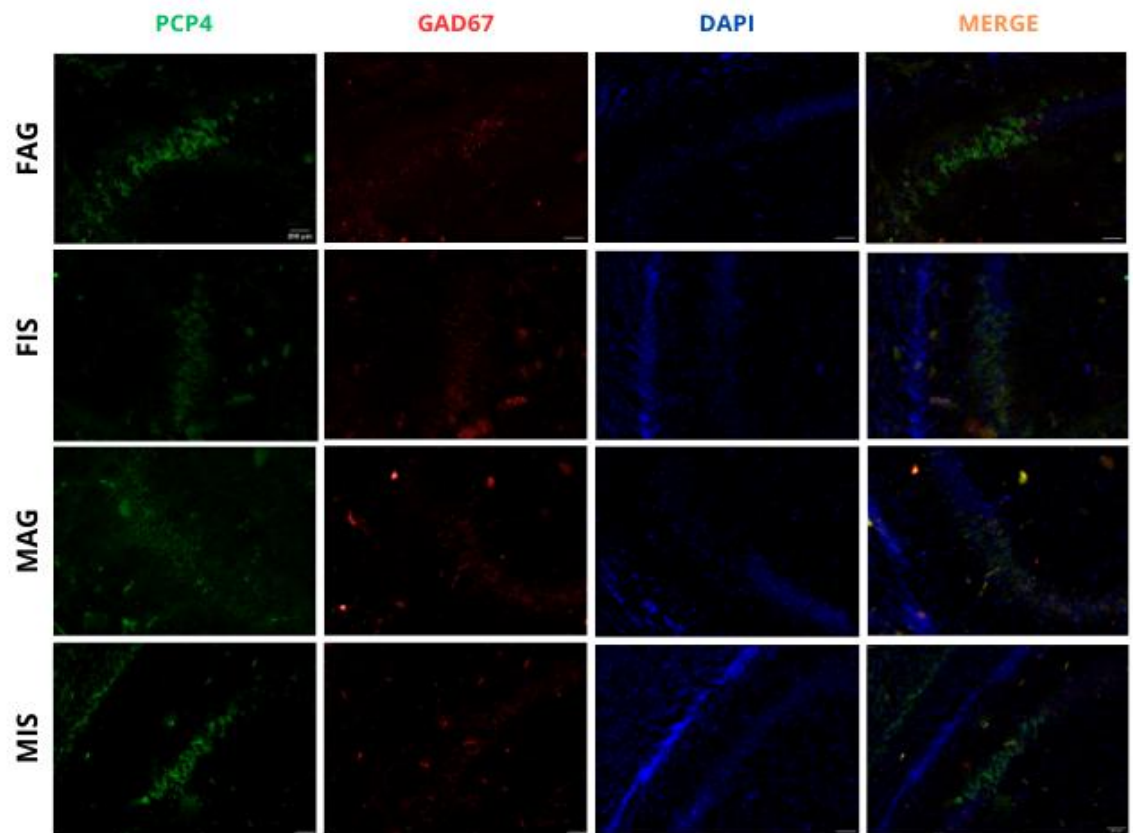
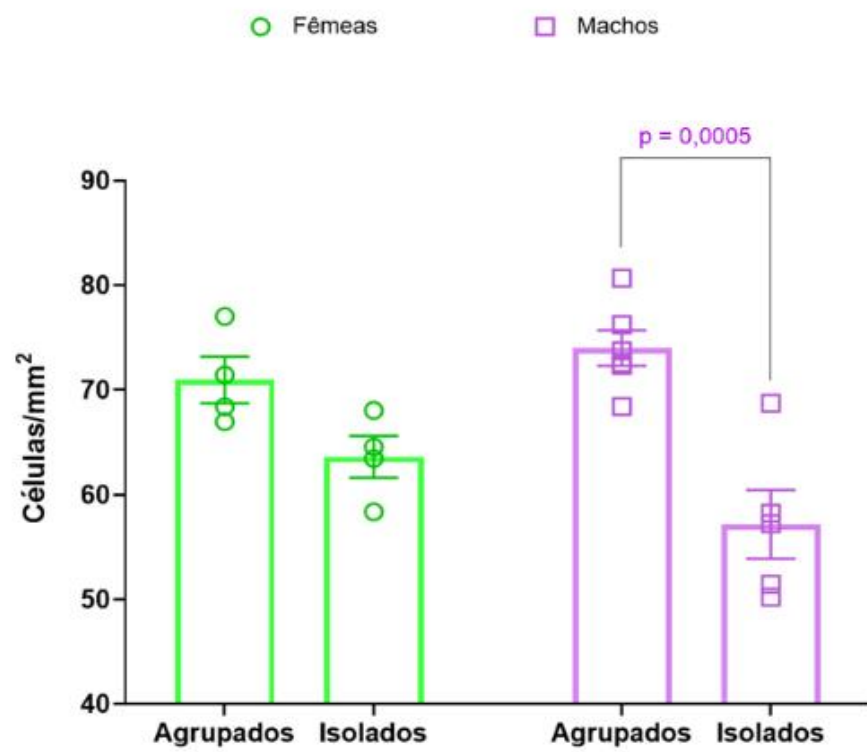
A**B**

Figura 20 – O isolamento social diminui a quantidade de GABA nas fibras musgosas de CA2 apenas em machos. (A) Imunofluorescência para marcação de fibras musgosas (PCP4) e GABA (GAD67) em CA2 (B) Foi feita uma análise ANOVA de duas vias comparando a quantidade de células colocalizadas para marcação de GAD67 e PCP4 e dividido pela área marcada. Houve diminuição na quantidade de GABA marcado em fibras musgosas apenas em machos isolados. Indicando uma diferença no efeito do isolamento social sexo dependente.

Conclui-se assim que o isolamento social diminui o tônus inibitório ao redor das fibras musgosas em CA2 somente em machos, em contrapartida, o IS aumenta o tamanho da região de maneira não significativa em machos e fêmeas. Porém, o aumento da região decorrente do IS é mais proeminente em fêmeas do que em machos.

6. DISCUSSÃO

Grande parte do conhecimento construído utilizando em sua maioria machos como sujeitos experimentais, tanto nesta área quanto nas neurociências como um todo. A sub-representação de fêmeas nas pesquisas criam um viés de gênero científico que foi desenvolvido por se achar que grupos de fêmeas apresentam uma variabilidade maior do que machos, misturar fêmeas e machos em um grupo reduz a força estatística e que fêmeas geram mais custo pela necessidade de acompanhamento do ciclo estral. Todavia, Berry (2018) fez um trabalho que coloca em xeque estas afirmações e estimula a inclusão de fêmeas nos trabalhos, quando possível. Nosso grupo apresenta uma sólida linha de pesquisa investigando a neurobiologia da memória social que em sua maioria também foi desenvolvida utilizando como sujeitos experimentais apenas machos (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019; GUARNIERI et al., 2020; GUSMÃO et al., 2012; MONTEIRO et al., 2014). Por isso, este trabalho se propõe a trabalhar com ambos os sexos e entender quais são suas peculiaridades e similaridades na memória social.

Como a tarefa de reconhecimento social depende do comportamento inato do animal de preferir o que é novo a ele, antes de testarmos a memória do animal, nos perguntamos se fêmeas e machos apresentam preferência por novidade social de maneira similar. Então, submetemos camundongos C57BL/06 de ambos os sexos ao teste de preferência por novidade social. Nossos resultados demonstraram que machos e fêmeas apresentam preferência pelo estímulo social novo. Complementarmente, ao somar o tempo total de investigação que machos e fêmeas passaram investigando os animais estímulos, percebemos que as fêmeas passaram mais tempo investigando que os machos. Isso pode indicar uma propensão maior a explorar a novidade social quando comparada com os machos. Este comportamento em fêmeas pode variar de intensidade ao longo do ciclo estral, mesmo apresentando a PNS fêmeas em diestro tendem a investigar mais que as em proestro (MARKHAM; JURASKA., 2007).

É importante salientar que os resultados obtidos pelo teste de preferência social são altamente variáveis, podendo ser influenciados de acordo com a linhagem, idade, espécie, sexo do animal estímulo e aparato utilizado. O próprio estudo que deu origem ao paradigma ao testar linhagens encontrou diferentes resultados (MOY et al.,

2004), enquanto Brandon e colaboradores (2010) indicaram que camundongos B57BL/06 não exibem preferência social utilizando a caixa de 3 compartimentos, mesmo aparato em que realizamos nossos experimentos.

Após nos certificarmos que ambos os sexos das linhagens que estamos utilizando apresentam a preferência inata à novidade, testamos a MS dos camundongos machos e fêmeas através do paradigma de reconhecimento social. Vimos que ambos os sexos apresentam a memória social quando submetidos ao nosso protocolo de TRS adaptado de Thor e Holloway (1982). Estes resultados estão de acordo com a literatura e nossos achados anteriores em machos (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019; GUARNIERI et al., 2020).

A partir destas observações aliado aos fatos de que a formação hipocampal apresenta uma alta concentração de receptores endocanabinóides do tipo 1 (LIU et al., 2003; HERKENHAM et al., 1991) que comprovadamente estão envolvidos na formação da MS, decidimos avaliar qual era o papel dos receptores CB1 na região de CA2 na evocação da memória social (LOYSE et al., 2022; PALMISANO et al., 2022). Os receptores de CB1 estão associados principalmente a neurônios pré-sinápticos GABAérgicos no hipocampo (IRVING et al., 2000) e em CA2 os endocanabinóides em conjunto com receptores DOR participam de mecanismo de desinibição da área. Onde, a estimulação de LTD em interneurônios da região, interneurônios CCK+ através de receptores CB1 e em interneurônios PV+ através de receptores DOR, diminui o tônus inibitório da região aumentando a plasticidade da área, e por consequência, a probabilidade da ocorrência de LTP's através da comunicação agora facilitada entre CA2-CA3, contribuindo na formação da memória social (CHEVALEYRE; SIEGELBAUM, 2010; ZHAO ET AL., 2007; LEROY et al., 2017; LOISY et al., 2022; PISKOROWSKI; CHEVALEYRE, 2013). Dessa forma, ao se bloquear os receptores CB1 em CA2 durante a evocação da memória espera-se que estes processos não aconteçam evitando que a região fique disponível no momento da evocação da MS. Por isso, bloqueamos a expressão destes receptores em CA2 utilizando o agonista inverso AM251 30 minutos antes da fase de teste da tarefa de RS. Os resultados do teste de reconhecimento social demonstraram que os animais que tiveram salina injetada em CA2 eram capazes de evocar a memória, enquanto os que receberam AM251 não. A partir disso, é possível afirmar que os receptores CB1 em CA2 são essenciais para a evocação da memória social.

Posto que machos e fêmeas em condições naturais apresentam a MS no paradigma de reconhecimento social de maneira similar, nos resultados descritos acima consideramos machos e fêmeas como um único grupo.

Dado nossos resultados anteriores de que o isolamento social de 7 dias afeta a MS e ainda não existem estudos relacionando os efeitos do IS com a região de CA2, analisamos quais são os efeitos do isolamento nesta porção do HIP. Primeiramente, avaliamos se os efeitos do IS na MS são expressos de maneira similar em camundongos machos e fêmeas (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019; GUARNIERI et al., 2020; GUSMÃO et al., 2012; MONTEIRO et al., 2014). De forma interessante, o isolamento prejudica a MS de camundongos C57 machos e fêmeas de maneira similar. Contudo, um dos dados publicados pelo nosso grupo de pesquisa havia demonstrado uma diferença entre camundongos swiss machos e fêmeas (GUARNIERI et al., 2020). Além do mais, outros estudos comprovaram que a percepção do isolamento social difere em fêmeas e machos pré-adolescentes, já que o IS altera propriedades neuroendócrinas intrínsecas dos neurônios corticotróficos do PVN de fêmeas que leva a diminuição da excitabilidade dos neurônios (SENST et al., 2016). Frente nossos resultados, o efeito sexo específico do IS aparenta depender também de fatores como linhagem do camundongo e idade, já que nossos animais experimentais eram adultos. Apesar disso, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos neurais que podem levar a estas diferenças comportamentais relacionadas ao isolamento.

Em relação ao efeito do isolamento na memória social, estudos recentes vêm apontando que IS agudos podem ter efeitos motivadores sociais e que aumentam a relevância da recompensa social o que afetam o tempo que o animal despende investigando o estímulo (TOMOVA et al., 2022). Como nosso protocolo é baseado no tempo de investigação do animal, este poderia ser um fator que prejudica nossas análises e criaria um viés. Por isso, resolvemos comparar o tempo de investigação total entre todos os grupos para saber se haveria diferença na quantidade total de investigação de cada grupo. Segundo nossos dados, todos os grupos investigaram o juvenil durante porções de tempo similares, indicando que a diferença entre o tempo de exploração entre treino e teste seria um fator confiável para nossas conclusões e não um artefato causado pelo isolamento

Por outro lado, o IS tem efeitos sexo dependente que afetam o comportamento, geralmente sendo mais pernicioso em fêmeas. Por exemplo, fêmeas isoladas apresentam níveis elevados de corticosterona no plasma e comportamentos do tipo ansioso, quando submetidas ao teste de labirinto em cruz elevado e teste do campo aberto, enquanto machos não apresentam essas alterações (TAKAHASHI et al., 2017; PALANZA et al., 2001). Essas alterações se estendem a níveis moleculares, já que fêmeas e machos cronicamente isolados apresentam diminuição na expressão de OCT e de GABA (GRIPPO et al., 2007; MUMTAZ et al., 2018). Ainda assim, pouco se sabe sobre os mecanismos que causam essas diferenças entre os sexos.

Agora sabendo que a expressão da MS em machos e fêmeas é semelhante, nos hipotetizamos que talvez um dos mecanismos pelo qual o isolamento prejudica a MS seja através da alteração da inibição na região de CA2, já que esta é uma área que apresenta uma inibição basal mais robusta, e se este efeito é sexo dependente. Desse modo, analisamos a quantidade de GABA liberado nas fibras musgosas de CA2 de camundongos machos e fêmeas isolados e agrupados através de uma imunofluorescência utilizando GAD67 e PCP4. De maneira intrigante, somente os machos isolados apresentaram diminuição na liberação de GABA nas fibras musgosas em CA2, indicando para um possível efeito do IS que difere entre os sexos. A região de CA2 apresenta uma densa população de receptores de estrogênio que são mais abundantes sem fêmeas, podendo ser associados dessa maneira a comportamentos diferentes de machos e fêmeas. Uma vez que, existe uma relação direta entre a expressão das enzimas GAD e a sinalização por estrógenos: a expressão de mRNA GAD está relacionada ao estradiol (HUDGENS ET AL., 2009; MCCARTHY ET AL., 1995). Dado que a maioria das células com receptores de estrogênio alfa no hipocampo são GABAérgicas (HART ET AL., 2001), é possível que a excitabilidade das células daquela região também seja mediada pelo estradiol que em situações de estresse, como o IS, tende a aumentar sua expressão (VIAU; MEANE., 1992). Em conjunto, essas características mais proeminentes em fêmeas poderiam agir como um fator que preserva os níveis de GABA, levando a um efeito diminuto do IS neste grupo.

A região de CA2 é sensível a mudanças ambientais, animais recém-nascidos quando mantidos em ambiente enriquecidos apresentam alterações nas propriedades de suas células piramidais, como a plasticidade sináptica glutamatérgica CA2-CA3

(CARSTENS et al., 2016). Além disso, a fisiologia de suas células também são sensíveis à sinalização de estresse por mineralocorticóides (MCCANN et al., 2019). Ao se considerar que o isolamento social é uma condição ambiental estressora que sabidamente pode levar a disfunções GABAérgicas (MATSUMOTO et al., 2007), o efeito dessa condição em CA2 levaria a diminuição na quantidade de GABA nas fibras musgosas que conectam esta porção do HIP a outras regiões, prejudicando a comunicação entre áreas e a própria função. Por consequência, esses eventos levariam a déficits nos processos mnemônicos sociais descritos como efeitos do isolamento. De certa forma, não seria improvável se pensar que o decréscimo na quantidade de GABA liberado em CA2 em animais isolados prejudicaria a sinalização de CB1 em CA2, processo que depende do funcionamento correto de interneurônios e é central em diferentes etapas da formação da MS (LOYSE et al., 2022). Frente nossos resultados e a atual literatura sobre o tema, ainda são necessários mais estudos para confirmar esta hipótese, principalmente por existir uma diferença no efeito do IS na região de CA2 de machos e fêmeas sem necessariamente haver uma expressão distinta da MS.

Além de investigar a liberação de GABA pelas fibras, investigamos também se o tamanho da região foi alterado pelo IS através da análise da área total marcada. Nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre o tamanho de CA2 dos animais agrupados e isolados, tanto machos quanto fêmeas. Apesar de não ser significativo, ao se comparar as fêmeas isoladas com os machos, vimos que o aumento da região em decorrência do isolamento social foi maior nas fêmeas que nos machos. Apesar do que estes resultados sugerem, são necessários estudos mais detalhados para conclusões mais precisas, já que a medida utilizada para definição do tamanho da área foi baseada em uma marcação indireta da área total.

Em suma, nossos resultados sugerem que a expressão do comportamento social e os efeitos do IS na tarefa de reconhecimento social não difere entre camundongos C57/BL6 machos e fêmeas. Para além disso, observamos que ao bloquear os receptores CB1 em CA2 a evocação da MS é prejudicada. Ademais, o isolamento social reduz a quantidade de GABA somente em machos, porém o efeito de aumento da região de CA2 decorrente do IS é mais proeminente em camundongos fêmeas.

7. CONCLUSÃO

Em síntese, concluímos que o comportamento de reconhecimento social e preferência por novidade social em machos e fêmeas é expresso de maneira semelhante. Apesar do prejuízo causado pelo IS na MS de machos e fêmeas também serem similares, o efeito de diminuição no tônus inibitório de fibras musgosas de CA2 só é observado em machos. Logo, existem diferenças sexo dependentes nas alterações causadas pelo isolamento em CA2 que não são observáveis a nível de comportamento. Em conjunto, vimos que os receptores CB1 em CA2 associados a atividade de interneurônios são cruciais para a evocação da memória social. Porém, a relação entre estes receptores e o isolamento ainda carece de mais estudos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALEXANDER, R. The Evolution of Social Behavior. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 5, p. 325-383, 1974. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.es.05.110174.001545>.

ALMEIDA-SANTOS, A. F. et al. Social isolation impairs the persistence of social recognition memory by disturbing the glutamatergic tonus and the olfactory bulb dorsal hippocampus coupling. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

ALTMAN, J. Autoradiographic Regenerative Cells Study Proliferation with Tritiated of Degenerative of Neuroglia Thymidine. *Experimental Neurology*, v. 318, n. 4, p. 302–318, 1962a.

AMARAL, D. G.; WITTER, M. P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience*, v. 31, n. 3, p. 571–591, 1989.

AMARAL, David; LAVENEX, Pierre. Hippocampal Neuroanatomy. In: ANDERSEN, Per; MORRIS, Richard; AMARAL, David; BLISS, Tim; O'KEEFE, John. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, 2007. p. 37-110.

ASOK, A. et al. Molecular Mechanisms of the Memory Trace. *Trends in Neurosciences*, v. 42, n. 1, p. 14–22, 2019.

Baddeley, A. D. (1990). The development of the concept of working memory: Implications and contributions of neuropsychology. In G. Vallar & T. Shallice (Eds.), *Neuropsychological impairments of short-term memory* (pp. 54–73). Cambridge University Press.

BARTESAGHI, R.; RAVASI, L. Pyramidal neuron types in field CA2 of the guinea pig. *Brain Res Bull*, v. 50, n. 4, p. 263-273, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(99\)00198-7](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(99)00198-7).

BENOY, A.; DASGUPTA, A.; SAJIKUMAR, S. Hippocampal area CA2: an emerging modulatory gateway in the hippocampal circuit. *Experimental Brain Research*, v. 236, n. 4, p. 919-931, 2018. DOI: 10.1007/s00221-018-5187-5.

BIRD, C. M. The role of the hippocampus in recognition memory. *Cortex*, v. 93, n. 0, 73p. 155–165, 2017.

BUCKNER, Randy L. Memory systems: An incentive, not an endpoint. In: ROEDIGER III, Henry L.; DUDAI, Yadin; FITZPATRICK, Susan M. *Science of Memory: Concepts*. New York: Oxford University Press, 2007. p. 359-366.

BURROWS, M.; ROGERS, S. M.; OTT, S. R. Epigenetic remodelling of brain, body and behaviour during phase change in locusts. *Neural Systems & Circuits*, 2011;1(11). doi: 10.1186/2042-1001-1-11.

CACIOPPO, J. T.; HAWKLEY, L. C. Social isolation and health, with an emphasis on underlying mechanisms. *Perspect Biol Med*, 2003;46(3 Suppl):S39-S52.

CACIOPPO, J. T.; HAWKLEY, L. C.; THISTED, R. A. Perceived social isolation makes me sad: 5-year cross-lagged analyses of loneliness and depressive symptomatology in the Chicago Health, Aging, and Social Relations Study. *Psychol*

Aging, 2010 Jun;25(2):453-63. doi: 10.1037/a0017216. PMID: 20545429; PMCID: PMC2922929.

CACIOPPO, J. T.; HUGHES, M. E.; WAITE, L. J.; HAWKLEY, L. C.; THISTED, R. A. Loneliness as a specific risk factor for depressive symptoms: cross-sectional and longitudinal analyses. *Psychol Aging*, 2006;21(1):140-151. doi:10.1037/0882-7974.21.1.140.

CACIOPPO, J. T.; NORRIS, C. J.; DECETY, J.; MONTELEONE, G.; NUSBAUM, H. In the eye of the beholder: individual differences in perceived social isolation predict regional brain activation to social stimuli. *J Cogn Neurosci*, 2009 Jan;21(1):83-92. doi: 10.1162/jocn.2009.21007. PMID: 18476760; PMCID: PMC2810252.

CAMATS PERNA, J.; ENGELMANN, M. Recognizing Others: Rodent's Social Memories. *Curr Top Behav Neurosci*, v. 30, p. 25-45, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1007/7854_2015_413.

CARSTENS, K. E.; PHILLIPS, M. L.; POZZO-MILLER, L.; WEINBERG, R. J.; DUDEK, S. M. Perineuronal nets suppress plasticity of excitatory synapses on CA2 pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience*, v. 36, n. 23, p. 6312–6320, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0245-16.2016>.

CARSTENS, K. E.; DUDEK, S. M. Regulation of synaptic plasticity in hippocampal area CA2. *Curr Opin Neurobiol*, v. 54, p. 194-199, fev. 2019. doi: 10.1016/j.conb.2018.07.008. PMID: 30120016; PMCID: PMC6361679.

CASTEL, M.; MORRIS, J. The neurophysin-containing innervation of the forebrain of the mouse. *Neuroscience*, v. 24, p. 937–966, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90078-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90078-4).

CEMBROWSKI, M. S. et al. Spatial Gene-Expression Gradients Underlie Prominent Heterogeneity of CA1 Pyramidal Neurons. *Neuron*, v. 89, n. 2, p. 351-368, 2016. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.12.013.

CHEN, P.; HONG, W. Neural Circuit Mechanisms of Social Behavior. *Neuron*, v. 98, n. 1, p. 16-30, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.026>.

CHEVALEYRE, V.; SIEGELBAUM, S. A. Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disinaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron*, v. 66, p. 560-572, 2010.

CHOLERIS, E. et al. Involvement of estrogen receptor alpha, beta and oxytocin in social discrimination: A detailed behavioral analysis with knockout female mice. *Genes Brain Behav*, v. 5, n. 7, p. 528-539, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00203.x>.

CUI, Z.; GERFEN, C. R.; YOUNG, W. S. 3rd. Hypothalamic and other connections with dorsal CA2 area of the mouse hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, v. 521, n. 8, p. 1844-1866, 2013. DOI: 10.1002/cne.23263.

CYMERBLIT-SABBA, A.; WALSH, C.; DUAN, K. Z.; SONG, J.; HOLMES, O.; YOUNG, W. S. Simultaneous Knockouts of the Oxytocin and Vasopressin 1b

Receptors in Hippocampal CA2 Impair Social Memory. Preprint. bioRxiv. 2023;2023.01.30.526271. Published 2023 Jan 30. DOI: 10.1101/2023.01.30.526271.

DE OLIVEIRA ALVARES, Lucas; DO-MONTE, Fabricio H. Understanding the dynamic and destiny of memories. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 125, p. 592–607, 12 mar. 2021.

DENIRO, D. A. Perceived alienation in individuals with residual-type schizophrenia. *Issues in Mental Health Nursing*, v. 16, n. 3, p. 185–200, 1995.

DEVITO, L. M. et al. Vasopressin 1b receptor knock-out impairs memory for temporal order. *Journal of Neuroscience*, v. 29, p. 2676–2683, 2009.

DEVITO, L. M. et al. Vasopressin 1b receptor knock-out impairs memory for temporal order [published correction appears in *J Neurosci*. 2009 Apr 15;29(15):5044]. *Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 9, p. 2676–2683, 2009. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5488-08.2009.

DHARANI, S.; RAKKIYAPPAN, R.; CAO, J. New delay-dependent stability criteria for switched Hopfield neural networks of neutral type with additive time-varying delay components. *Neurocomputing*, v. 151, p. 827–834, 2015.

DONOVAN, N. J.; BLAZER, D. Social Isolation and Loneliness in Older Adults: Review and Commentary of a National Academies Report. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 28, n. 12, p. 1233–1244, 2020. DOI: 10.1016/j.jagp.2020.08.005.

DUDAI, Y. THE NEUROBIOLOGY OF CONSOLIDATIONS, OR, HOW STABLE IS THE ENGRAM? *Annu. Rev. Psychol*, v. 55, p. 51–86, 2004.

DUDAI, Y.. Memory: It's all about representations. In: ROEDIGER, H. L., III; DUDAI, Y.;

DUDAI, Y.; KARNI, A.; BORN, J. The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron*, v. 88, n. 1, p. 20–32, 2015. doi:10.1016/j.neuron.2015.09.004. DUDAI, Y. Memory from A to Z: keywords, concepts and beyond. Oxford: [s.n.].

DUDAI, Yadin. Memory from A to Z: Keywords, Concepts, and Beyond. [S.l.]: Oxford University Press, 2004.

DUDAI, Yadin. Memory: It's all about representations. In: ROEDIGER III, Henry L.; DUDAI, Yadin; FITZPATRICK, Susan M. *Science of Memory: Concepts*. New York: Oxford University Press, 2007. p. 13–16.

DUDAI, Yadin. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current opinion in neurobiology*, v. 12, n. 2, p. 211–216, abr. 2002.

DUDAI, Yadin. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual review of psychology*, v. 55, p. 51–86, 2004b.

DUDEK, S. M.; ALEXANDER, G. M.; FARRIS, S. Rediscovering area CA2: unique properties and functions. *Nat Rev Neurosci*, v. 17, p. 89–102, 2016.

DUDEK, S. M.; ALEXANDER, G. M.; FARRIS, S. Rediscovering area CA2: unique properties and functions. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 17, p. 89-102, 2016.

DUDEK, S. M.; ALEXANDER, G. M.; FARRIS, S. Rediscovering area CA2: unique properties and functions. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 17, n. 2, p. 89-102, 2016. DOI: 10.1038/nrn.2015.22.

EICHENBAUM, H. AND COHEN, N.J. (2001) *From Conditioning to Conscious Recollection: Memory Systems of the Brain*. Oxford University Press, New York.

EISENBERGER NI. The pain of social disconnection: examining the shared neural underpinnings of physical and social pain. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(6):421-434. Published 2012 May 3. doi:10.1038/nrn3231

EMPTAGE, N. J.; CAREW, T. J. Long-Term Synaptic Facilitation in the Absence of Short-Term Facilitation in Aplysia Neurons. n. 5, p. 253–256, [s.d.].

ENDO, K. et al. Preference for Solitude, Social Isolation, Suicidal Ideation, and Self-Harm in Adolescents. *J Adolesc Health*, v. 61, n. 2, p. 187-191, 2017. doi:10.1016/j.jadohealth.2017.02.018.

ENGELMANN, M.; HÄDICKE, J.; NOACK, J. Testing declarative memory in laboratory rats and mice using nonconditional social discrimination procedure. *Nat. Protoc.*, v. 6, p. 1152–1162, 2011.

ENGELMANN, M.; WOTJAK, C. T.; LANDGRAF, R. Social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiol. Behav.*, v. 58, p. 315–321, 1995. ENGELMANN, M.; HÄDICKE, J.; NOACK, J. Testing declarative memory in laboratory rats and mice using the nonconditioned social discrimination procedure. *Nature Protocols*, v. 6, n. 8, p. 1152–1162, 2011.

ENGELMANN, M.; WOTJAK, C. T.; LANDGRAF, R. Social discrimination procedure: An alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiology and Behavior*, 1995.

EVANS, P. R. et al. RGS14 Restricts Plasticity in Hippocampal CA2 by Limiting Postsynaptic Calcium Signaling. *eNeuro*, v. 5, n. 3, ENEURO.0353-17.2018, jun. 2018. doi: 10.1523/ENEURO.0353-17.2018.

EVANS, P. R. et al. RGS14 Restricts Plasticity in Hippocampal CA2 by Limiting Postsynaptic Calcium Signaling. *eNeuro*, v. 5, n. 3, ENEURO.0353-17.2018. Published 2018 Jun 4. DOI: 10.1523/ENEURO.0353-17.2018.

FERBINTÉANU, J. Memory systems 2018—Towards a new paradigm. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 157, p. 61–78, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.11.005>.

FERGUSON, J. N. et al. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet*, v. 25, n. 3, p. 284-288, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/77040>.

FERGUSON, J. N.; YOUNG, L. J.; INSEL, T. R. The neuroendocrine basis of social recognition. *Front Neuroendocrinol*, v. 23, n. 2, p. 200-224, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/frne.2002.0229>.

FERNANDEZ-LAMO, I. et al. Proximodistal Organization of the CA2 Hippocampal Area. *Cell Reports*, v. 26, n. 7, p. 1734-1746.e6, 2019. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.01.060.

FERNANDEZ-LAMO, I. et al. Proximodistal Organization of the CA2 Hippocampal Area. *Cell Reports*, v. 26, n. 7, p. 1734-1746.e6, 2019. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.01.060.

FITZPATRICK, S. M. (ORGS.). *Science of memory: Concepts*. New York, NY, US: Oxford University Press Science of memory, 2007. 1ª ed, p.13-16.

FITZPATRICK, Susan M. *Science of Memory: Concepts*. New York: Oxford University Press, 2007. p. 1-9.

GALEF, B. G.; WIGMORE, S. W. Transfer of information concerning distant foods: a laboratory investigation of the 'information-centre' hypothesis. *Animal Behaviour*, v. 31, p. 748–758, 1983.

GALL, C.; SELAWSKI, L. Supramammillary afferents to guinea pig hippocampus contain substance P-like immunoreactivity. *Neurosci Lett*, v. 51, p. 171-176, 1984.

GRIPPO, A. J., ET AL. (2007). Social isolation induces behavioral and neuroendocrine disturbances relevant to depression in female and male prairie voles. *Psychoneuroendocrinology*, 32(8-10), 966-980.

GUARNIERI, L. O. et al. Pro-neurogenic effect of fluoxetine in the olfactory bulb is concomitant to improvements in social memory and depressive-like behavior of socially isolated mice. *Translational Psychiatry* 2020 10:1, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.

GUSMÃO, 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*, v. 228, n. 2, p. 440–446, 2012a.

Hackett RA, Hamer M, Endrighi R, Brydon L, Steptoe A. Loneliness and stress-related inflammatory and neuroendocrine responses in older men and women. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(11):1801-1809. doi:10.1016/j.psyneuen.2012.03.016

HAPPÉ, F.; COOK, J. L.; BIRD, G. The Structure of Social Cognition: In(ter)dependence of Sociocognitive Processes. *Annu Rev Psychol*, v. 68, p. 243-267, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010416-044046>.

HAWKLEY, L. C.; CACIOPPO, J. T. Loneliness matters: A theoretical and empirical review of consequences and mechanisms. *Annals of Behavioral Medicine*, v. 40, n. 2, p. 218–227, 2010.

HERKENHAM, M., LYNN, A. B., JOHNSON, M. R., MELVIN, L. S., DE COSTA, B. R., & RICE, K. C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *Journal of Neuroscience*, 11(2), 563-583. doi:10.1523/JNEUROSCI.11-02-00563.1991. PMID: 1992016; PMCID: PMC6575215.

HERRING, B. E.; NICOLL, R. A. Long-term potentiation: from CaMKII to AMPA receptor trafficking. *Annu Rev Physiol*, v. 78, p. 351-365, 2016.

HERRING, B. E.; NICOLL, R. A. Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking. *Annual Review of Physiology*, v. 78, p. 351-365, 2016. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021014-071753.

HITTI, F. L.; SIEGELBAUM, S. A. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*, v. 508, n. 7494, p. 88-92, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature13028>.

HOLMÉN, K.; ERICSSON, K.; WINBLAD, B. Social and emotional loneliness among non-demented and demented elderly people. *Arch Gerontol Geriatr*, v. 31, n. 3, p. 177-192, 2000. doi: 10.1016/s0167-4943(00)00070-4.

HOLT-LUNSTAD, J.; SMITH, T. B.; LAYTON, J. B. Social relationships and mortality risk: a meta-analytic review. *PLoS Med*, v. 7, n. 7, e1000316, 2010. doi: 10.1371/journal.pmed.1000316.

HUPBACH, A.; GOMEZ, R.; HARDT, O.; NADEL, L. Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. *Learn Mem*, v. 14, n. 1-2, p. 47-53, 2007. doi: 10.1101/lm.365707. PMID: 17202429; PMCID: PMC1838545.

IERACI, A.; MALLEI, A.; POPOLI, M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. *Neural Plasticity*, v. 2016, 2016.

IRVING, A. J., COUTTS, A. A., HARVEY, J., ET AL. (2000). Functional expression of cell surface cannabinoid CB(1) receptors on presynaptic inhibitory terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, 98(2), 253-262. doi:10.1016/s0306-4522(00)00120-2

IZQUIERDO, I. et al. Memory retrieval and its lasting consequences. *Neurotoxicity Research*, v. 4, n. 5–6, p. 573–593, 2002.

IZQUIERDO, I. et al. Novelty causes time-dependent retrograde amnesia for one-trial avoidance in rats through NMDA receptor- and CaMKII-dependent mechanisms in the hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, v. 11, n. 9, p. 3323–3328, set. 1999.

IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, v. 103, n. 1, p. 1–11, 1999.

IZQUIERDO, I. *Memória*. 2a Edição ed. [s.l.] Artmed, 2011.

JOSSELYN, Sheena A.; TONEGAWA, Susumu. Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science*, v. 367, n. 6473, 3 jan. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.aaw4325>>.

KANDEL, E. *Em Busca da Memória – O nascimento de uma nova ciência da mente*. São Paulo: Cia. Das Letras, 2009.

KELLIHER, K. R. The combined role of the main olfactory and vomeronasal systems in social communication in mammals. *Hormones and Behavior*, v. 52, n. 5, p. 561–570, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.08.012>.

KOGAN, J. H.; FRANKLAND, P. W.; SILVA, A. J. Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus*, v. 10, n. 1, p. 47-56, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(2000\)10:1<47::AID-HIPO5>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(2000)10:1<47::AID-HIPO5>3.0.CO;2-6)>.

KOHARA, K. et al. Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nat Neurosci*, v. 17, n. 2, p. 269-279, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nn.3614>.

KORTE, M.; SCHMITZ, D. Cellular and System Biology of Memory: Timing, Molecules, and Beyond. *Physiol Rev*, v. 96, n. 2, p. 647-693, 2016. doi: 10.1152/physrev.00010.2015.

KOSS, W. A.; FRICK, K. M. Sex differences in hippocampal function. *Journal of Neuroscience Research*, v. 95, n. 1-2, p. 539-562, 2017. DOI: 10.1002/jnr.23864.

LEE, C. R.; CHEN, A.; TYE, K. M. The neural circuitry of social homeostasis: Consequences of acute versus chronic social isolation [published correction appears in *Cell*. 2021 May 13;184(10):2794-2795]. *Cell*, v. 184, n. 6, p. 1500-1516, 2021. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.028.

LEE, H.-J.; CALDWELL, H. K.; MACBETH, A. H.; TOLU, S. G.; YOUNG, W. S. A conditional knockout mouse line of the oxytocin receptor. *Endocrinology*, v. 149, p. 3256–3263, 2008.

LEE, H.-J.; MACBETH, A. H.; PAGANI, J. H.; YOUNG, W. S. Oxytocin: the great facilitator of life. *Progress in Neurobiology*, v. 88, p. 127–151, 2009.

LEHR, A. B. et al. Silencing hippocampal CA2 reduces behavioral flexibility in spatial learning. *Hippocampus*, v. 33, n. 6, p. 759-768, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/hipo.23521>.

LLORENS-MARTIN, M. et al. Novel connection between newborn granule neurons and the hippocampal CA2 field. *Exp Neurol*, v. 263, p. 285-292, 2015.

LOISY, M. et al. Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation. *Neuron*, v. 110, n. 17, p. 2854-2866.e4, 2022. DOI: 10.1016/j.neuron.2022.06.013.

LOISY, M. et al. Sequential inhibitory plasticities in hippocampal area CA2 and social memory formation. *Neuron*, v. 110, n. 17, p. 2854-2866.e4, 2022. DOI: 10.1016/j.neuron.2022.06.013.

LUNARDI, P. et al. On the novel mechanisms for social memory and the emerging role of neurogenesis. *Brain Res Bull*, v. 171, p. 56-66, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.03.006>.

MARKHAM, J. A.; JURASKA, J. M. Social recognition memory: influence of age, sex, and ovarian hormonal status. *Physiol Behav*, v. 92, p. 881–888, 2007. MATTHEWS, G. A.; TYE, K. M. Neural mechanisms of social homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1457, n. 1, p. 5–25, 15 dez. 2019.

MATSUMOTO K, PUJA G, DONG E, PINNA G. GABA(A) receptor neurotransmission dysfunction in a mouse model of social isolation-induced stress:

possible insights into a non-serotonergic mechanism of action of SSRIs in mood and anxiety disorders. *Stress*. 2007;10(1):3-12. doi:10.1080/10253890701200997

MATTHEWS, G. A.; TYE, K. M. Neural mechanisms of social homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1457, n. 1, p. 5-25, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nyas.14016>.

MCCANN, K. E., LUSTBERG, D. J., SHAUGHNESSY, E. K., CARSTENS, K. E., FARRIS, S., ALEXANDER, G. M., RADZICKI, D., ZHAO, M., & DUDEK, S. M. (2019). Novel role for mineralocorticoid receptors in control of a neuronal phenotype. *Molecular Psychiatry*, 5, 1–15.

MEIRA, T. et al. A hippocampal circuit linking dorsal CA2 to ventral CA1 critical for social memory dynamics. *Nat Commun*, v. 9, p. 4163, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06501-w>.

MONTEIRO, B. M. M. et al. Enriched environment increases neurogenesis and improves social memory persistence in socially isolated adult mice. *Hippocampus*, v. 24, n. 2, p. 239–248, 2014.

MOSCOVITCH, Morris. Memory: Why the engram is elusive. In: ROEDIGER III, Henry L.; DUDAI, Yadin; FITZPATRICK, Susan M. *Science of Memory: Concepts*. New York: Oxford University Press, 2007. p. 17-21.

MUMTAZ, F., KHAN, M. I., ZUBAIR, M., & DEHPOUR, A. R. (2018). Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model—A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 1205-1222.

NADER, K. Reconsolidation and the Dynamic Nature of Memory. p. 1–16, 2015.

NORMAN, K. A.; O'REILLY, R. C. Modeling hippocampal and neocortical contributions to recognition memory: A complementary-learning-systems approach. *Psychological Review*, v. 110, n. 4, p. 611–646, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1037/0033-295X.110.4.611>.

OKAMOTO, K.; IKEGAYA, Y. Recurrent connections between CA2 pyramidal cells. *Hippocampus*, v. 29, n. 4, p. 305-312, 2019. DOI: 10.1002/hipo.23064.

OKAMOTO, K.; IKEGAYA, Y. Recurrent connections between CA2 pyramidal cells. *Hippocampus*, v. 29, n. 4, p. 305-312, 2019. DOI: 10.1002/hipo.23064.

OKUYAMA, T. Social memory engram in the hippocampus. *Neurosci Res*, v. 129, p. 17-23, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.05.007>.

OLIVA, A. et al. Role of Hippocampal CA2 Region in Triggering Sharp-Wave Ripples. *Neuron*, v. 91, n. 6, p. 1342-1355, 2016. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.08.008.

OLIVA, A. et al. Role of Hippocampal CA2 Region in Triggering Sharp-Wave Ripples. *Neuron*, v. 91, n. 6, p. 1342-1355, 2016. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.08.008.

Packard, M. G., Hirsh, R., & White, N. M. (1989). Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: Evidence for multiple memory systems. *Journal of Neuroscience*, 9, 1465–1472.

PALANZA, P., GIOIOSA, L., & PARMIGIANI, S. (2001). Social stress in mice: gender differences and effects of estrous cycle and social dominance. *Physiology & Behavior*, 73(3), 411-420.

PALMISANO, M. et al. Hippocampal Deletion of CB1 Receptor Impairs Social Memory and Leads to Age-Related Changes in the Hippocampus of Adult Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 1, p. 26, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24010026>.

PALMISANO, M., GARGANO, A., OLABIYI, B. F., LUTZ, B., & BILKEI-GORZO, A. (2022). Hippocampal Deletion of CB1 Receptor Impairs Social Memory and Leads to Age-Related Changes in the Hippocampus of Adult Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 26. doi:10.3390/ijms24010026

PAUL, J. R.; SQUIRE, L. R. *Parallel Brain Systems for Learning with and without Awareness*. 2002.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd Edition. San Diego: Academic Press, 2001.

PERISSINOTTO, C. M.; COVINSKY, K. E. Living alone, socially isolated or lonely-what are we measuring? *J Gen Intern Med*, v. 29, n. 11, p. 1429-1431, 2014. doi: 10.1007/s11606-014-2977-8. ROEDIGER III, Henry L.; DUDAI, Yadin;

PISKOROWSKI, R. A.; NASRALLAH, K.; DIAMANTOPOULOU, A.; MUKAI, J.; HASSAN, S. I.; SIEGELBAUM, S. A.; GOGOS, J. A.; CHEVALEYRE, V. Age-Dependent Specific Changes in Area CA2 of the Hippocampus and Social Memory Deficit in a Mouse Model of the 22q11.2 Deletion Syndrome. *Neuron*, v. 89, n. 1, p. 163-176, 2016. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.11.036. PMID: 26748091; PMCID: PMC4706988.

RADZICKI, D.; CHONG, S.; DUDEK, S. M. Morphological and molecular markers of mouse area CA2 along the proximodistal and dorsoventral hippocampal axes. *Hippocampus*, v. 33, n. 3, p. 133-149, 2023. DOI: 10.1002/hipo.23509.

RAO, R. P. et al. Neuronal Responses to Conspecifics in the Ventral CA1. *Cell Reports*, v. 27, n. 12, p. 3460-3472.e3, 2019. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.05.081.

RIVERA, D. S. ET AL. "Live together, die alone": The effect of re-socialization on behavioural performance and social-affective brain-related proteins after a long-term chronic social isolation stress. *Neurobiol Stress*, v. 14, p. 100289, 2020. DOI: 10.1016/j.ynstr.2020.100289. PMID: 33426200; PMCID: PMC7785960.

ROEDIGER, Henry L., III; DUDAI, Yadin; FITZPATRICK, Susan M. (Org.). *Science of memory: Concepts*. v. 446, 2007. Disponível em: <<https://psycnet.apa.org/fulltext/2007-14484-000.pdf>>.

SAN ANTONIO, A. et al. Distinct physiological and developmental properties of hippocampal CA2 subfield revealed by using anti-Purkinje cell protein 4 (PCP4) immunostaining. *J Comp Neurol*, v. 522, n. 6, p. 1333-1354, abr. 2014. doi: 10.1002/cne.23486. PMID: 24166578; PMCID: PMC4001794..

SANCHEZ-ANDRADE, G.; KENDRICK, K. M. The main olfactory system and social learning in mammals. *Behav Brain Res*, v. 200, n. 2, p. 323-335, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.12.021>.

SCHACTER, D. L.; TULVING, E. *Memory Systems*. [s.l.] MIT Press, 1994.

SCHACTER, Daniel L. Memory: Delineating the core. In: ROEDIGER III, Henry L.; DUDAI, Yadin; FITZPATRICK, Susan M. *Science of Memory: Concepts*. New York: Oxford University Press, 2007. p. 23-27.

SCHACTER, Daniel L.; EICH, James Eric; TULVING, Endel. Richard Semon's theory of memory. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior*, v. 17, n. 6, p. 721-743, 1 dez. 1978.

SCHACTER, Daniel L.; WAGNER, Anthony D. Aprendizado e memória. In: KANDEL, Eric R.; SCHWARTZ, James H.; JESSELL, Thomas M.; SIEGELBAUM, Steven A.; HUDSPETH, A.J.. *Princípios de Neurociências*. Artmed, 2014. p. 1256-1272.

SCHOENFELD, T. J.; GOULD, E. Stress , stress hormones , and adult neurogenesis. *Experimental Neurology*, v. 233, n. 1, p. 12-21, 2012.

SEMON, R. *The mneme*. [s.l.] London: Allen & Unwin, 1921.

Senst, L., Baimoukhametova, D., Sterley, T.-L., & Bains, J. S. (2016). Respostas neuronais sexualmente dimórficas ao isolamento social. *eLife*, 5, e18726. <https://doi.org/10.7554/eLife.18726>

SIMONS, S. B. et al. Regional differences in hippocampal calcium handling provide a cellular mechanism for limiting plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 106, p. 14080-14084, 2009.

SIMONS, S. B.; ESCOBEDO, Y.; YASUDA, R.; DUDEK, S. M. Regional differences in hippocampal calcium handling provide a cellular mechanism for limiting plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, p. 14080-14084.

SQUIRE, L. R. et al. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci*, v. 8, n. 11, p. 872-883, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrn2154>.

SQUIRE, L. R. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 82, n. 3, p. 171-177, 2004.

SQUIRE, L. R. *Nondeclarative Memory: Multiple Brain Systems Supporting Learning*. v. 4, n. 3, 1984. Squire, L. R. *Memory and brain*. Nova York: Oxford University Press, 1987.

STARESINA, B. P.; WIMBER, M. A Neural Chronometry of Memory Recall. *Trends in Cognitive Sciences*, v. 23, n. 12, p. 1071-1085, 2019.

SUN, Q. et al. Proximodistal Heterogeneity of Hippocampal CA3 Pyramidal Neuron Intrinsic Properties, Connectivity, and Reactivation during Memory Recall. *Neuron*, v. 95, n. 3, p. 656-672.e3, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.012>.

TAKAHASHI, A., CHUNG, J. R., ZHANG, S., ET AL. (2017). Establishment of a repeated social defeat stress model in female mice. *Scientific Reports*, 7, 12838. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12811-8>

TANG, A. C. et al. Effects of long-term estrogen replacement on social investigation and social memory in ovariectomized C57BL/6 mice. *Hormones and behavior*, v. 47, n. 3, p. 350-357, 2005.

TANG, A. C. et al. Effects of long-term estrogen replacement on social investigation and social memory in ovariectomized C57BL/6 mice. *Hormones and Behavior*, v. 47, p. 350–357, 2005.

TERRANOVA, J. P. et al. An estrogen-dependent four-gene micronet regulating social recognition: a study with oxytocin and estrogen receptor-alpha and -beta knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, p. 6192–6197, 2003.

THOMPSON, C. L. et al. Genomic anatomy of the hippocampus. *Neuron*, v. 60, n. 6, p. 1010–1021, 2008.

THOR, D. H.; HOLLAWAY, W. R. Social memory of the male laboratory rat. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, v. 96, p. 1000–1006, 1982.

TOMOVA, L., WANG, K. L., THOMPSON, T., ET AL. (2022). Author Correction: Acute social isolation evokes midbrain craving responses similar to hunger. *Nature Neuroscience*, 25(3), 399. doi:10.1038/s41593-021-01004-2

TONEGAWA, Susumu; MORRISSEY, Mark D.; KITAMURA, Takashi. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nature reviews. Neuroscience*, 59v. 19, n. 8, p. 485–498, ago. 2018.

TULVING, E. Elements of episodic memory. [s.l: s.n.].

TULVING, E. Episodic memory and autonoesis: Uniquely human? In H. S. Terrace, & J. Metcalfe (Eds.), *The Missing Link in Cognition* (pp. 4-56). NewYork, NY: Oxford University Press. *Cognition*, p. 4–56, 2005.

VAN DER KOOIJ, M. A.; SANDI, C. Social memories in rodents: methods, mechanisms and modulation by stress. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 36, n. 7, p. 1763-1772, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.10.006>.

VIAU, V., & MEANEY, M. J. (1992). Basal and stress hypothalamic pituitary adrenal activity in cycling and ovariectomized steroid treated rats. *Endocrinology*, 131, 1261–1269.

WANG, Z. J., SHWANI, T., LIU, J., ET AL. (2022). Molecular and cellular mechanisms for differential effects of chronic social isolation stress in males and females. *Molecular Psychiatry*, 27(7), 3056-3068. doi:10.1038/s41380-022-01574-y

WEISKRANTZ, L. Neuroanatomy of memory and amnesia: a case for multiple memory systems. *Human Neurobiology*, v.6, n.2, p.93-105, 1987.

WERSINGER, S. R.; TEMPLE, J. L.; CALDWELL, H. K.; YOUNG, W. S. Inactivation of the oxytocin and the vasopressin (Avp) 1b receptor genes, but not

the Avp 1a receptor gene, differentially impairs the Bruce effect in laboratory mice (*Mus musculus*). *Endocrinology*, v. 149, p. 116–121, 2008.

WHEELER, L.; REIS, H.; NAZLEK, J. Loneliness, social interaction, and sex roles. *Journal of Personality and Social Psychology*, v. 45, p. 943–955, 1983. WILSON, R. S. et al. Loneliness and risk of Alzheimer disease. *Archives of General Psychiatry*, v. 64, n. 2, p. 234–240, 2007.

WYATT, T. D. Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. 2010. p. 685–700.

WYATT, T. D. Pheromones. 2017. p. 739–743.

YOUNG, W. S.; LI, J.; WERSINGER, S. R.; PALKOVITS, M. The vasopressin 1b receptor is prominent in the hippocampal area CA2 where it is unaffected by restraint stress or adrenalectomy. *Neuroscience*, v. 143, p. 1031–1039, 2006.

ZHAO, M. et al. Synaptic plasticity (and the lack thereof) in hippocampal CA2 neurons. *J Neurosci*, v. 27, p. 12025–12032, 2007. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4094-07.2007>.

ZILKHA, N., SOFER, Y., KASHASH, Y., & KIMCHI, T. (2021). The social network: Neural control of sex differences in reproductive behaviors, motivation, and response to social isolation. *Current Opinion in Neurobiology*, 68, 137–151. doi:10.1016/j.conb.2021.03.005